



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DEL ACIDO GALACTURONICO EN LA PRODUCCION DE PECTINASAS EXTRACELULARES POR *Aspergillus* sp CH-Y-1043, SOBRE CASCARA DE LIMON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: ABIGAIL RAMIREZ SILVA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1999

280511



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

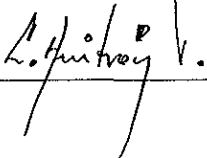
Presidente	LILIA VIERNA GARCÍA
Vocal	JORGE SOTO SORIA
Secretario	CARLOS HUITRON VARGAS
1er suplente	RODOLFO PASTELIN PALACIOS
2do suplente	JOSE PEDRAZA CHAVERRI

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

ASESOR

Dr. Carlos Huitrón Vargas



SUPERVISOR TECNICO

Q.F.B. Rosalba Pérez Villalva



SUSTENTANTE

Abigail Ramírez Silva



AGRADECIMIENTOS

Con gran sinceridad agradezco al Dr. Carlos Huitrón V. del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por su apoyo, asesoría y consejos durante la realización de este trabajo, así como a la Dra. Ma. Elena Flores por sus comentarios y sugerencias para la conclusión de la tesis.

A Rosalba P. V. por contribuir en la asesoría técnica de este trabajo, pero sobre todo por la grata amistad que me ha brindado.

A la Sra. Guille y al Sr. Eduardo por la valiosa labor que ofrecen en el laboratorio.

DEDICATORIAS

Especialmente a Hector H. N. por la amistad y apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

A mis padres Norma y Fernando por todo el cariño y respeto que les tengo.

A mi hermana Meli (Gabriela), por ser mi compañera de juegos y tierna amiga.

A todos y cada uno de los integrantes que conforman mi numerosa y gran familia.

I. INTRODUCCION

En nuestro país existen diferentes subproductos considerados desechos que se forman como resultado de la actividad agrícola o agroindustrial; los principales son el bagacillo de caña de azúcar, la cáscara de limón y de naranja, la pulpa de henequén y de remolacha, entre otros. Estos subproductos constituyen un vasto recurso natural que debido a su composición química (celulosa hemicelulosa, pectina, lignina, etc.), a su abundancia y biodisponibilidad podrían ser utilizados como materia prima en procesos biotecnológicos para la obtención de enzimas, proteínas, compuestos químicos, entre otros.

Las pectinasas conforman un complejo multienzimático donde participan distintas enzimas para degradar a las sustancias pécticas. Existen enzimas como las endo-pectinasas que son de tipo inducible y por lo tanto requieren la adición de pectina o algún sustrato que la contenga para estimular su biosíntesis. En México, un subproducto abundante producido por la industrialización del limón, es su cáscara, la cual tiene un alto contenido de pectina, por lo que se ha considerado como un buen inductor y sustrato para la producción de estas enzimas. Las enzimas pectinolíticas tienen mucha importancia en la industria de alimentos durante el procesamiento de frutas y vegetales, particularmente en la elaboración de jugos de fruta. Actualmente en nuestro país, el mercado de las pectinasas en esta industria va en aumento y existe gran interés en producirlas, ya que hoy en día las enzimas pectinolíticas que son utilizadas son importadas, a pesar que este país es uno de los principales productores de limón y cuenta con grandes cantidades de cáscara de limón.

Las sustancias pécticas están constituidas por una cadena lineal de moléculas de ácido galacturónico unidas por enlaces glicosídicos α -1,4 en donde, de mayor a menor grado, los grupos carboxilo constituyentes están esterificados con metanol. Debido a la complejidad de estos sustratos poliméricos, se requiere de varios tipos de enzimas pectinolíticas, las cuales se clasifican de acuerdo a su forma de atacar al sustrato, en dos grandes grupos: pectinesterasas (PE) y despolimerasas. Las PE rompen enlaces éster removiendo los grupos metoxilo presentes en el carboxilo del ácido galacturónico y las despolimerasas rompen enlaces glicosídicos α -1,4 de la cadena principal de pectina ya sea por hidrólisis (poligalacturonasas PG) ó por β -eliminación (pectina liasa PL).

Estas enzimas son producidas por bacterias, levaduras, hongos y plantas. Dependiendo del tipo de enzima y del organismo que las produzca, su localización puede ser intracelular, extracelular o periplasmática, sin embargo en hongos es muy común que sean extracelulares.

Desde el punto de vista comercial los hongos filamentosos, en especial del género *Aspergillus*, son los más empleados para la producción de pectinasas, debido a que sus enzimas son extracelulares y producen principalmente endopoligalacturonasas las cuales tienen mayor aplicación en la industria de alimentos, por su capacidad de facilitar la precipitación de las sustancias pécticas, disminuir la viscosidad de los jugos de frutas y en particular para la clarificación del jugo de manzana.

Con el fin de aislar, seleccionar y posteriormente mejorar hongos filamentosos que estén adaptados naturalmente a crecer en lugares donde se producen desechos lignocelulósicos como cáscara de limón, bagacillo de caña y pulpa de henequén, se tomaron muestras de suelo y desechos descompuestos en

diferentes zonas del país. A partir de una de ellas, proveniente de una zona henequenera del estado de Yucatán, se aisló y seleccionó un hongo filamentoso denominado *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, en el cual se ha identificado una actividad constitutiva exo-PG y cuatro actividades pectinolíticas extracelulares diferentes (pectinasas tipo endo y exo, PL y PE), cuando es cultivado en pectina ó en desechos lignocelulósicos. Además, este microorganismo tiene la capacidad de producir tres o cuatro veces mas actividad endopectinolítica cuando es desarrollado sobre cáscara de limón que cuando se cultiva en pectina bajo las mismas condiciones. Por otro lado, esta cepa ha demostrado tener potencial para la producción de pectinasas a mayor escala, ya que tiene pocos requerimientos nutricionales, produce mayor actividad endo-PG a 37°C que a 29°C y la máxima producción de estas enzimas se lleva a cabo en valores extremos de pH (2-8), el cual puede inhibir el crecimiento bacteriano.

Los fenómenos regulatorios ejercidos sobre la biosíntesis de las pectinasas producidas por *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 han sido estudiados adicionando diversos compuestos al medio de cultivo para interpretar su efecto fisiológico a través del incremento, la disminución o desaparición de la actividad pectinolítica. De esta manera fue establecido que estas enzimas son inducibles por pectina y pectato, pero aún no se conoce el inductor o los inductores directo(s). En general, los inductores son moléculas pequeñas que provienen de la degradación del sustrato polimérico, que disparan la producción de las enzimas necesarias para la degradación del mismo y es bastante común que en estas circunstancias, la síntesis de una enzima inducible se multiplique varias veces. De ahí la importancia del estudio de formas de favorecer las condiciones para obtener una mayor inducción o estimulación de las pectinasas.

En *Aspergillus sp* CH-Y-1043, se ha encontrado un efecto estimulador sobre la producción de la actividad pectinolítica cuando se adiciona ácido galacturónico (AG) al medio de producción con pectina como principal fuente de carbono. El efecto estimulador se detectó básicamente sobre la producción de la actividad tipo endo-pectinolítica, con un incremento hasta del 100%. Estos datos hacen interesante el análisis del efecto de la adición del AG, pero utilizando cáscara de limón como fuente de carbono, ya que como fue mencionado anteriormente, el hongo produce mayor cantidad de enzimas pectinolíticas en este sustrato. De encontrarse alguna estimulación se debería favorecer la producción de endo-pectinasas a mayor escala aprovechando un subproducto, renovable, abundante, disponible y no tóxico, como es la cáscara de limón.

Por estas razones en este laboratorio se tiene interés en explorar si existe estimulación por la adición de AG sobre la producción de enzimas pectinolíticas, cuando la cepa de *Aspergillus sp*. CH-Y-1043 es cultivada en cáscara de limón.

OBJETIVO

Evaluar la producción de pectinasas extracelulares tipo endo por *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 cultivado bajo diferentes condiciones en medio mínimo, con cáscara de limón, cuando se adiciona ácido galacturónico,

HIPOTESIS

El ácido galacturónico (AG) es capaz de estimular la producción de endopectinasas extracelulares de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, cuando se cultiva sobre cáscara de limón.

II. ANTECEDENTES

SUSTANCIAS PÈCTICAS

Las sustancias pècticas forman un grupo de polisacàridos que junto con la celulosa y la hemicelulosa, son los componentes mäs abundantes de las plantas, se encuentran localizadas en la lamela media de las cèlulas vegetales y tienen como función la adhesión celular, contribuyendo a dar estructura y firmeza a los tejidos vegetales. En el caso de la pectina cítrica su peso molecular es aproximadamente de 23,000 a 71,000 Daltones (Luh y Phaff, 1951, Porwal y Chakravarli, 1970).

Las sustancias pècticas se emplean en la industria alimentaria para la elaboración de mermeladas y jamones, mientras que en la industria farmacèutica se utilizan como aditivos en los medicamentos por su acción detoxificante, hemostática y antifibrinolítica (Voragen et al., 1995). También son utilizadas, en ésta industria, como lubricante intestinal (Fogarty y Kelly, 1983). Estructuralmente éstas sustancias forman una cadena lineal de molèculas de àcido galacturònico, unidas por enlaces glicosídicos α -1,4. en donde algunos o todos los grupos carboxilo constituyentes pueden estar esterificados con metanol. A esto último se le conoce como grado de esterificación (DE) de las sustancias pècticas. Así la pectina se subdivide en base a su grado de esterificación, en pectinas de alta metoxilación cuando su grado de esterificación (DE) es mayor del 50%, y de baja metoxilación, si su DE es menor del 50% (Be Miller, 1986). Se ha reportado

que si menos del 10% de grupos carboxilos estan metoxilados se denomina entonces ácido pectico o poligalacturónico (Voragen et al., 1995).

Se ha descrito que el DE en la pectina depende tanto de la especie de los vegetales de donde se extrae, como de los tejidos y madurez del vegetal; pero en general las sustancias pècticas en la naturaleza contienen del 60 al 90 % de esterificación.

El DE influye en la solubilidad de la pectina y por tanto en la firmeza y cohesión de los tejidos vegetales, un DE reducido provoca mayor cohesión en los tejidos.

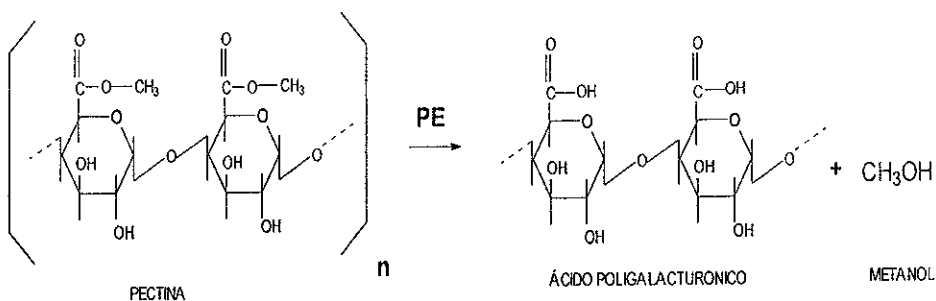
Dentro de las sustancias pècticas ha sido identificada la presencia de dos tipos de regiones: 1) regiones no sustituidas que contienen exclusivamente unidades de ácido galacturónico metoxilado o no metoxilado que son facilmente degradadas por pectinasas y 2) regiones altamente sustituidas llamadas "hairy" que son mas dificiles de degradar. En las regiones hairy la L-ramnosa es el sustituyente mas abundante que se encuentra unida a la molécula del galacturonato por enlaces α -1,2. Las ramnosas, unidas a la cadena principal de las sustancias pècticas constituyen los ramnogalacturonanos en donde han sido identificados varios azúcares como la L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa y L-fucosa (Voragen et al., 1995 y Pilnik y Voragen, 1993).

PECTINASAS

Las pectinasas son un grupo de enzimas por lo general extracelulares que tienen acción degradativa sobre las sustancias pécticas, intervienen en la patogénesis de plantas, ya que se ha demostrado que los hongos, primero secretan éstas enzimas para degradar el tejido de los vegetales y posteriormente entrar y colonizar las células vegetales (Visser y Voragen, 1996).

Estas enzimas se clasifican, por la forma del sustrato que degrada, en dos grupos: a) Pectinesterasas y B) Despolimerasas.

A) Las pectinesterasas (PE) rompen enlaces ester removiendo los grupos metoxilos presentes en el carboxilo del ácido galacturónico dando como producto final ácido poligalacturónico y metanol.

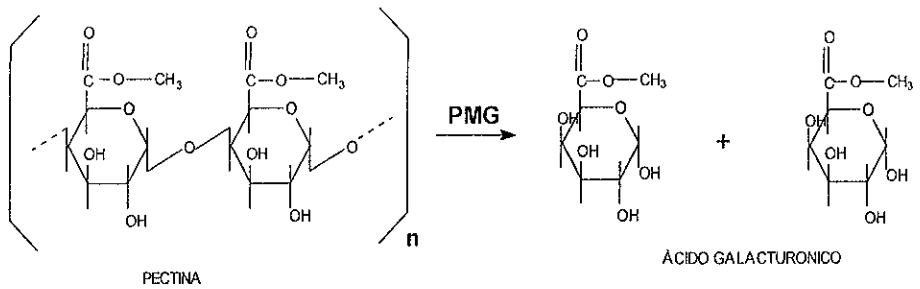


B) Las despolimerasas rompen enlaces glicosídicos α -1,4 de la cadena principal de la pectina actuando de dos maneras:

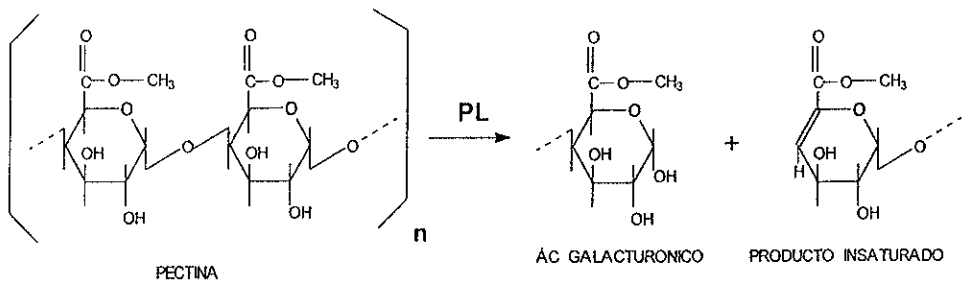
1. Por hidrólisis incorporando una molécula de agua a la pectina. Estas enzimas son llamadas

POLIMETILGALACTURONASAS (**PMG**), si actúan sobre pectina ó

POLIGALACTURONASAS (**PG**), si actúan sobre ácido poligalacturónico



2. Por β -eliminación, formando un doble enlace entre los átomos de carbono 4 y 5 de la molécula del galacturonato en la pectina, éstas enzimas se denominan POLIMETILGALACTURONATO LIASAS (*PMGL*), si actúan sobre pectina y POLIGALACTURONATOLIASAS (*PGL*) si actúan sobre ácido poligalacturónico, también es común que sean nombradas PECTINA LIASAS (*PL*) (Pilnik y Voragen, 1993).



Así mismo, todas las pectinasas mencionadas se subdividen en base a su sitio de acción, es decir si actúan sobre el extremo no reductor de la molécula de pectina o ácido poligalacturónico, se denominan de tipo “exo” y si actúan

aleatoriamente dentro de estas moléculas poliméricas se nombran de tipo “endo” (Fogarty y Kelly, 1983).

Voragen y Pilnik (1969), sugirieron que la velocidad de reducción de la viscosidad, con la velocidad de incremento en grupos reductores (rompimiento de uniones glucosídicas), podría ser usado para distinguir entre las enzimas hidrolíticas tipo “endo” y “exo”. Se hizo notar que un 50% de reducción en la viscosidad, acompañada por un incremento de reductores entre el 2% y 3%, indica una enzima tipo “endo”, en tanto que un resultado de 10% o más de reductores indica una enzima tipo “exo”.

Se han identificado otro tipo de enzimas que participan en la degradación de las sustancias pecticas, éstas son las OLIGOGALACTURONASAS (OGL) que actúan sobre oligómeros o dímeros de sustancias pecticas.

Como puede entenderse las pectinasas forman todo un sistema multienzimático listo para degradar hasta el más complejo sustrato pectico

APLICACIÓN DE LAS PECTINASAS

Las pectinasas son enzimas que se utilizan en diversos tipos de industrias para diferentes procesos. A continuación se mencionan algunas de las aplicaciones más relevantes de estas enzimas a nivel industrial.

- **EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS**

La adición de enzimas pectinolíticas a los jugos frutales, o bien a las frutas trituradas antes de su prensado, es actualmente una práctica usual en muchas industrias alimenticias. Las pectinasas se utilizan en esta industria para:

Clarificación y Brillantez. Debido al tamaño, carga y estructura de la pectina, estas tienden a formar micelas y hacen que se presenten fenómenos de adsorción. Así todas las partículas insolubles que están presentes en los jugos se diseminan dando como resultado turbiedad. Cuando las pectinasas entran en acción, convierten a las micelas en materiales solubles. El soporte que mantenía dispersas a las otras partículas no solubles es eliminado, y estas se precipitan al fondo. El líquido se clarifica y además, la disolución de los productos de la despectinización determinan una brillantez muy notable (Fogarty y Kelly, 1983; Pilnik, 1982).

Eliminación de problemas de filtración. Precisamente, por el hecho de que la pectina convierte a los jugos, mostos, etc. en suspensiones coloidales de alta viscosidad es que resulta difícil filtrarlos. Además, las grandes partículas de ese polisacárido tapan rápidamente los poros del filtro. Si la degradación producida por el proceso enzimático reduce tanto las partículas de la pectina como la

viscosidad del líquido es fácil comprender que la filtración se facilite (Fogarty y Kelly, 1983; Velasco, 1968).

Mejor Extracción del color para elaboración de vinos. Como las pectinasas rompen las uniones celulares de compuestos presentes en la cáscara de uva, el líquido solvente puede llegar a establecer mejor contacto con los pigmentos y se produce una mayor extracción del color. Además, el sabor y bouquet son más finos, suaves y agradables en los vinos tratados con estas enzimas (Fogarty y Kelly 1983; Velasco, 1968).

Reducción del tiempo de fermentación. El hecho de que los mostos se enriquezcan con materiales fermentables (unidades de ácido galacturónico ó polímeros de él no muy grandes) permite un mayor desarrollo de las levaduras, las cuales realizan mejor su labor. La reducción de la viscosidad del mosto también facilita la tarea de los microorganismos. Así como la expulsión del bióxido de carbono producido.

- ***EN LA INDUSTRIA TEXTIL***

Durante el enriado de algunas fibras textiles las pectinasas desdoblan los materiales pècticos presentes entre las fibras de celulosa, reduciendo su dureza y facilitando de esta forma la desfibración del lino (*Linum usitatissimo*), el cañamo (*Cannabis sativa*), y el yute (*Corchorus sp*), (Deuel y Stutz, 1958; Fogarty y Ward, 1974; Rombouts y Pilnik, 1980).

- *EN OTRAS INDUSTRIAS*

Las pectinasas, son empleadas en la fermentación del fruto del café, de la cocoa y las hojas del tabaco (Deuel y Stutz, 1958, Rombouts y Pilnik, 1980, Taylor y Richardson 1979)

En la preservación de maderas las enzimas pècticas son empleadas para aumentar la permeabilidad de los preservadores (Fogarty y Ward, 1974, Rombouts y Pilnik, 1980).

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PECTINASAS

Existe una gran variedad de organismos microscòpicos y macroscòpicos capaces de producir pectinasas, entre los cuales destacan: bacterias, hongos, levaduras y plantas (Pilnik y Rombouts, 1981), sin embargo se ha comprobado que no existe un organismo en la naturaleza, capáz de producir todas las actividades pectinolíticas que se han reportado por separado.

Las bacterias comunmente producen PGL y solo algunas PG y PE, como es el caso de *Clostridium multifementans* y *Erwinia carotovora* (Fogarty y Ward, 1974).

Los hongos en cambio producen una mayor variedad de actividades pectinolíticas y algunos producen hasta tres o cuatro actividades diferentes como es el caso de *Aspergillus niger* (Fogarty y Ward, 1974).

Desde un punto de vista comercial los hongos filamentosos y algunas levaduras son preferidos en la industria. Las principales razones se resumen como sigue:

- Los hongos producen pectinasas de forma extracelular, lo cual presenta ventajas para su recuperaciòn del caldo de fermentaciòn (Fogarty y Ward 1974). La cantidad de enzimas que son secretadas fuera de la célula, es limitada y por lo tanto es relativamente mas fácil aislarlas de una mezcla de proteínas, además este tipo de enzimas presentan una estructura mas compacta y son menos suceptibles a la desnaturalizaciòn

- El pH y la temperatura óptima de actividad de éstas enzimas, son similares a las condiciones de uso en la elaboración de jugos de frutas (Fogarty y Ward 1974).
- Los hongos producen principalmente endopoligalacturonasas, que son las enzimas de mayor aplicación a nivel industrial, por su capacidad de disminuir la viscosidad.

La producción comercial de las enzimas pectinolíticas se lleva a cabo esencialmente con especies del género *Aspergillus*, siendo *Aspergillus niger* uno de los más utilizados porque produce mayor cantidad de endopoligalacturonasas (endo-P) y una mezcla de pectinasas que facilitan la degradación de la pectina (Whitaker, 1990), pues hay que recordar que la pectina, presente en la naturaleza, contiene regiones dentro de su polímero que pueden estar o no metoxiladas, por lo que se requiere tanto de PMG, como de PG para lograr una total degradación.

REGULACION EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS

En su hábitat natural, la célula se enfrenta a una diversidad de fuentes potenciales de energía. La supervivencia de una especie en este ambiente competitivo ha resultado de su capacidad para adaptarse a su medio ambiente; al hacerlo se produce la maquinaria enzimática necesaria para la degradación de una amplia gama de compuestos orgánicos. Esta maquinaria se encuentra regulada por mecanismos que responden directa o indirectamente al medio ambiente.

Las enzimas involucradas en el catabolismo de ciertos compuestos pueden ser sintetizadas solo cuando está presente el sustrato correspondiente, o bien sustratos análogos, éstos últimos son aquellos que la enzima no ataca pero inducen su producción, estas sustancias análogas son mejor conocidas como inductores. Generalmente el inductor es un sustrato del sistema enzimático, pero en algunos casos puede ser el producto de la reacción, como ocurre en las enzimas que degradan polímeros, aunque también existen sustancias químicas relacionadas con el inductor que estimulan la producción enzimática pero que no son metabolizables, a los cuales se les conoce como: "inductores gratuitos". El modelo para explicar el fenómeno de inducción consiste en que se produce una proteína denominada represor, la cual bloquea el gene operador e impide que la polimerasa del ácido ribonucleico transcriba el mensaje contenido en esa fracción de ADN (Jacob y Monod, 1961). Por el contrario una vez que se adiciona un inductor al sistema, éste se une al represor previniendo su unión al operador y resultando con ello la traducción de los genes estructurales y la formación de las enzimas involucradas. Existen varios ejemplos de enzimas que dependen de este sistema de regulación como por ejemplo las involucradas en el catabolismo de los

carbohidratos. lactosa (lac) (Bourgeois, 1971), y arabinosa (ara), (Englesberg y Wilcox, 1974), así como del aminoácido L-triptofano (trp) (Morino y Snell, 1967). Gracias al proceso de inducción, las enzimas son rápidamente formadas cuando se necesitan.

Otro mecanismo que regula la producción enzimática es la represión catabólica, en la cual la síntesis de una enzima es suspendida cuando se ofrece al organismo una fuente de energía catabolizable, es decir, el crecimiento del microorganismo ocurre con la fuente de energía más fácil de metabolizar, a fin de evitar el gasto de energía, por sintetizar enzimas necesarias para degradar sustratos más complejos. Un ejemplo típico de represión catabólica es el efecto negativo que ejerce la glucosa sobre la síntesis de beta-galactosidasa en *Escherichia coli*, incubada en presencia de lactosa (Moses y Prevost, 1966). En 1968 Perlman et. al., dieron la pauta para explicar las bases moleculares del fenómeno al reportar que el efecto de glucosa era revertido por 3'-5'-monofosfato de adenosina (AMPcíclico). La concentración intracelular de este compuesto decrece hasta 1000 veces en presencia de glucosa ya que dicho carbohidrato inhibe la actividad de la enzima adenilciclasa, responsable de la formación de AMPcíclico a partir de ATP. El AMPcíclico aumenta la frecuencia de transcripción a través de incrementar la afinidad de la polimerasa de RNA por el gene promotor. Para llevar a cabo dicho efecto el AMPcíclico debe unirse previamente a una proteína (crp) que tiene un peso molecular aproximadamente de 45,000 daltones.

Los avances en el conocimiento de la forma en que se controla la síntesis de enzimas, podría aprovecharse en la producción de enzimas de interés industrial.

Los estudios concernientes a este tema han sido enfocados hacia la inducción, por la ventaja que presenta el conocer cuales son los agentes inductores en la producción de enzimas a mayor escala y poder aplicar dichos conocimientos.

En hongos aún cuando son menos conocidos los aspectos regulatorios de la síntesis de enzimas, se ha reportado que celulasas y xilanasas son inducibles por fragmentos de los polisacáridos correspondientes, los cuales entran a la célula y aceleran la síntesis de las enzimas. El conocimiento acerca de como se lleva a cabo el proceso de inducción a nivel molecular es hasta ahora poco conocido y varias evidencias sugieren que los sistemas que gobiernan la síntesis de enzimas en hongos no son tan simples como la regulación del operón Lac (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Aún así se ha demostrado que las xilanasas de *Trichoderma reesei* son inducidas por L-sorbosa un mosacárido parecido estructuralmente a la xilosa (Jianping et al., 1998) La B-xilosidasa y la endo xilanasas en *Streptomyces sp* CH-Y-1043, son inducidas por xilano y xilosa, lo cual resulta interesante si tenemos en cuenta que tanto el polímero como los monosacáridos del xilano, son utilizados como fuente de carbono, pero también son capaces de promover la producción de estas enzimas, sugiriendo con esto que los mecanismos regulatorios de inducción del sistema xilanolítico, de este microorganismo, no son tan simples (Flores et al. 1996).

Con respecto a los mecanismos regulatorios de enzimas pépticas en hongos, se han realizado estudios adicionando diferentes fuentes de carbono al

medio de cultivo para interpretar su efecto en la regulación a través de los cambios de la enzima de interés (Maldonado et al., 1989). Así se ha reportado, que cuando *Aspergillus niger*, es desarrollado en un medio con 2% de sacarosa y 2% de pectina las enzimas pectinolíticas (PE, PG Y PMG) son producidas cuando la concentración de sacarosa disminuye, lo cual indica un mecanismo de regulación por represión catabólica, de éstas enzimas. También se ha visto en una mutante de *Aspergillus niger*, que requiere adenina para la producción de PG, es sensible a represión catabólica por intermediarios de la glicólisis, y que la represión parece estar ha nivel de traducción, pues la concentración del RNA mensajero fue estable (Shinmyo et al., 1978).

En cuanto a los inductores directos de la producción de enzimas pécticas, se sabe que la síntesis de endo-P en *Pyrenochaeta terrestris* es reprimida cuando el medio con pectina es suplementado con glucosa u otras hexosas a concentración de 0.05 M., pero es estimulada a concentraciones de 0.005 M (Keen y Horton, 1966). Por otro lado, Phaff (1974) sugirió que el D-galactarato (ácido mucico), es el inductor de la síntesis de las pectinesterasas (PE) y poligalacturonasas (PG) de *Penicillium chrysogenum*. Así mismo, la pectina y el ácido galacturónico indujeron en forma diferencial la síntesis de pectinasas de *Fusarium roseum* (Perley y Page, 1971). La síntesis de pectina liasa (PL) en *Fusarium verticillium*, es también inducible por pectina y reprimida por azúcares reductores (Holz y Knox-Davies, 1986, Carder et al., 1989). Sin embargo, a pesar de los estudios realizados sobre los mecanismos regulatorios de inducción en la producción de pectinasas, actualmente no se conoce si son uno o varios

compuestos, los involucrados en la inducción de las enzimas que componen el sistema pectinolítico en hongos.

PECTINASAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus sp* CH-Y-1043

Como ya se mencionó, desde un punto de vista comercial los hongos filamentosos, en especial del género *Aspergillus*, son los más empleados para la producción de pectinasas. Las pectinasas son generalmente enzimas inducibles, por lo que es necesaria la adición de pectina o algún sustrato que la contenga para estimular su biosíntesis pero en parte, por su alto costo la pectina purificada no es conveniente emplearla en la formulación del medio de producción a nivel industrial, y además porque se ha visto que no pueden utilizarse concentraciones mayores porque disminuye la producción de endo-P.

En este sentido, en nuestro laboratorio fue aislado y seleccionado de una zona henequenera del estado de Yucatán un hongo filamentoso, que es capaz de utilizar como única fuente de carbono un desecho agroindustrial rico en pectina, para favorecer la producción de enzimas pécticas. Así, se logró aislar y seleccionar a un hongo denominado *Aspergillus sp* CH-Y-1043, el cual está adaptado naturalmente a crecer en desechos agroindustriales, como cáscara de limón y que además tiene potencial para producir pectinasas a mayor escala, ya que produce mayor actividad de endopoligalacturonasas cuando es cultivado en éste desecho (sin pretratamiento), que cuando es desarrollada en sustratos puros (Larios et al., 1989), Esta cepa presenta pocos requerimientos nutricionales y su producción

màxima se lleva acabo a valores extremos de pH (2.8), lo que evita, en parte, contaminación del cultivo por bacterias además, se ha demostrado que la actividad específica de los filtrados libres de células, producidos por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, es mayor que la presentada en algunas preparaciones comerciales (Saval, 1985).

Respecto a los mecanismos regulatorios en este hongo, se ha observado represión catabólica de enzimas pécticas, ya que una elevada acumulación de grupos reductores disminuye la producción pectinolítica en el medio de fermentación. Posteriormente se demostrò que al no existir acumulación de estas moléculas, utilizando un sistema de cultivo alimentado y una concentración de pectina limitada, la actividad específica de las pectinasas, se incrementaba hasta 5 veces en relación al control (Aguilar y Huitròn, 1986).

Los fenómenos regulatorios de inducción en este microorganismo han sido estudiados adicionando compuestos al medio de cultivo para interpretar su efecto fisiológico en la regulación a través del incremento, la disminución o desaparición de la actividad pectinolítica (Aguilar y Huitròn 1987; Maldonado et al., 1989). De esta manera fue establecido que la producción de enzimas pectinolíticas son inducibles por pectina, pectato o los productos de su degradación, aunque el inductor directo aún no se conoce. En este sentido se sabe que el AG ejerce un efecto estimulador en la producción de endo-pectinasas, cuando es adicionado al medio de cultivo conteniendo pectina como fuente de carbono. Dicho efecto fue detectado básicamente en la producción de la actividad tipo endo-pectinolítica (endo-P) y el incremento en la producción, debido a la adición del AG fue del 100% en relación a los cultivos en donde no se adiciono AG (Aguilar y Huitròn, 1987).

El sistema pectinolítico es complejo y existe poca información acerca de inductores directos que estimulen la producción de endo-P extracelulares y de las otras actividades pectinolíticas. Por eso, y por el potencial que presenta *Aspergillus* sp CH-Y-1043, en la producción de éstas enzimas, en el laboratorio hay interés en explorar con mas detalle el efecto que ejercería el AG, en la producción de la actividad endo-P, utilizando como fuente de carbono a un sustrato renovable, abundante y disponible, como es la cáscara de limón, ya que de encontrarse un efecto estimulador en la producción de la actividad, en un futuro podría ser ventajoso dicho conocimiento en la producción de las pectinasas a mayor escala.

III. MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMO UTILIZADO. La cepa utilizada en éste trabajo fue un hongo filamentoso denominado *Aspergillus sp* CH-Y-1043, aislado y seleccionado de suelo en una zona henequenera del estado de Yucatán. Tiene la característica de producir mayor actividad de pectinasas extracelulares cuando es cultivado a una temperatura de 37°C sobre pectina ó cáscara de limón como única fuente de carbono.

REACTIVOS UTILIZADOS

La pectina cítrica, D-ácido galacturónico monohidratado, albúmina sérica bovina, reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu, fueron obtenidos de SIGMA. Sulfato de cobre, ácido acético, tartrato de sodio y potasio, carbonato de sodio, dextrosa, sulfato de amonio, fosfato de potasio mono y di básico, fenol, metabisulfito de sodio e hidróxido de sodio fueron obtenidos de J.T. Baker. EL ácido 3,5-dinitrosalisílico de la compañía Aldrich Chemical, el agar de papa dextrosa (PDA) de MERCK y el agar bacteriológico de DIFCO. Como sustrato nativo se utilizó cáscara de limón deshidratada obtenida de Grindsted de México en Tecomán, Colima

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO A. Agar de PDA (Papa dextrosa Agar) a pH de 5.6 suplementado con 0.25% más de agar bacteriológico. El medio fue esterilizado a 121°C durante 20 minutos, se inclinaron los tubos, se dejaron solidificar y se les realizó prueba de esterilidad.

MEDIO B. Se preparó en agua destilada conteniendo KH_2PO_4 al 0.05%; K_2HPO_4 al 0.05%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ al 0.4%. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: Cáscara de limón (CL), Pectina y Ácido Galacturónico (AG); todas al 1.0%, excepto cuando se indique otra concentración en las figuras. El medio fue

esterilizado a 121°C durante 20 minutos y se le ajustó el pH inicial (pHi) a 2.8, excepto cuando se indique otro valor en las figuras.

PROPAGACION Y CONSERVACION DE LA CEPA

La cepa se propagó sembrándola por estria en tubos de 16 X 150 mm de MEDIO A inclinado, incubada a 37°C por tres días. Para la conservación de la cepa, ésta se mantuvo a 4°C hasta por un mes.

PREPARACION DEL INOCULO.

Se tomo uno de los tubos donde se propagó la cepa y se colectaron las esporas resuspendiendolas en 5ml de agua estéril para sembrarlas por dispersión en la superficie de 30ml de MEDIO A contenido en matraces Erlenmeyer de 250ml. Todo se realizó en condiciones estériles. Los matraces se incubaron a 37°C durante 72 horas, después de ese tiempo fueron removidas las esporas, adicionando agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica total de cinco ($D_{0.1}=5$), a 540 nm, en un espectrofotómetro (Bausch y Lomb Spectronic 21). El inóculo empleado fue de 1.0ml por cada 100.0ml de MEDIO B, ó el inóculo que se indique en cada Figura.

PRODUCCION DE ENZIMAS.

La producción de las pectinasas se realizó en matraces Erlenmeyer de 500ml conteniendo 200ml del MEDIO B, con la fuente de carbono deseada al 1%, si no se indica otro valor en las leyendas de las figuras. Los matraces ya inoculados, se incubaron a 37°C con una agitación de 200 rpm. en una incubadora agitadora rotatoria Psyrotherm G-26 (New Brunswick Scientific). Posteriormente, el D-ácido galacturónico fue adicionado al medio en condiciones asépticas a las 24 horas de fermentación ó al tiempo que se indique en las Figuras. Se adicionaron 10.0 ó 1.0 ml de una solución estéril de D-ácido galacturónico a una concentración de 20.0 mg ml⁻¹ a 200.0ml del MEDIO B, para obtener una concentración final de 1.0 mg ml⁻¹ ó de 0.1 mg ml⁻¹ respectivamente. Los experimentos en donde se adicionó la solución de D-ácido galacturónico se especifican en las figuras.

Posteriormente se tomaron muestras de 5.0ml a diferentes tiempos (como se indica en las figuras) durante 5 días. Las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3500 rpm. en una centrífuga clínica (Solbat), separando el sobrenadante ó filtrado libre de células de la biomasa. Los filtrados libres de células fueron utilizados para determinar la actividad enzimática endo-P.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONASA

La actividad se determinò por la disminuciòn de la viscosidad de una soluciòn de pectina, por acciòn de endo-P extracelulares. Para este mètodo se utilizo un viscosimetro tipo Oswald (Kimax 200), el cual se mantuvo en un bañõ con circulaciòn continua a 30°C. En tubos de ensaye se agregaron 10ml de pectina al 1.0%, en soluciòn amortiguadora de acetato de sodio 0.2N, ajustada a pH de 4.2. Los tubos con la soluciòn de pectina se preincubaron 10 minutos en el bañõ a 30°C. En el tiempo cero a esta soluciòn de pectina se le agregó una alicuota de 0.5ml de filtrado enzimático, se agito ràpidamente, se adicionò al viscosimetro por la entrada y se aplicò succiòn por la salida hasta que la soluciòn llegò al menisco superior del viscosimetro. Se tomo el tiempo de flujo de la mezcla de reacciòn al bajar la soluciòn del menisco superior al inferior, èsta operaciòn se repite 4 veces durante un tiempo no mayor a 10 minutos. Sé prepararon dos blancos uno de sustrato y otro de agua, con 10ml de pectina y 10ml de agua respectivamente los cuales fueron preincubados 10 minutos en el bañõ de agua a 30°C, y posteriormente se les adicionò 0.5ml de agua a cada uno, finalmente se les midiò el tiempo de flujo, obteniéndose un promedio de cuatro determinaciones en cada uno. Los cálculos se realizaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones :

$$Fr = (T_s - T_w) / (T_t - T_w)$$

$$T_n = (T_f / 120) \cdot Tr$$

Donde:

Fr= Fluidez relativa de cada tiempo de reacciòn.

Tn= Tiempo de reacciòn en minutos mas un medio del tiempo de flujo en minutos.

T_s= Tiempo de flujo promedio del blanco de pectina en segundos.
T_w= Tiempo de Flujo promedio del blanco de agua en segundos
T_t= Tiempo de flujo de la mezcla de reacción en segundos
T_r= Tiempo de reacción desde la adición de la enzima al sustrato hasta cada inicio de la medición del tiempo de flujo, en minutos.

Con los valores obtenidos se calcula la fluidez relativa por cada uno de los tiempos de reacción. Se grafican los valores de la fluidez relativa (Fr) en las ordenadas y de los tiempos de reacción (Tn) en las abscisas, la pendiente de la línea recta obtenida corresponde al cambio de fluidez relativa de 0.1 por segundo en las condiciones del ensayo (Saval, 1985). Una unidad de endo-P se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.1 por segundo en la fluidez relativa a 30°C (Solis, 1988).

DETERMINACION DE PROTEINA EXTRACELULAR

Para realizar esta determinación, los filtrados libres de células se dializaron contra agua destilada, a una temperatura de 5°C durante 5 horas, con cambios de agua cada hora, colocándolos previamente en bolsas para diálisis (Spectra/Por), con capacidad de corte de 12000 a 14000 daltons,

La cantidad de proteína extracelular fue determinada por el método modificado de Lowry (1951), basado en la formación de un complejo colorido entre la proteína y el cobre y la reducción de la sal de fosfomolibdato de fosfotungstato por la tirosina y el triptofano (Clark y Switzer, 1977).

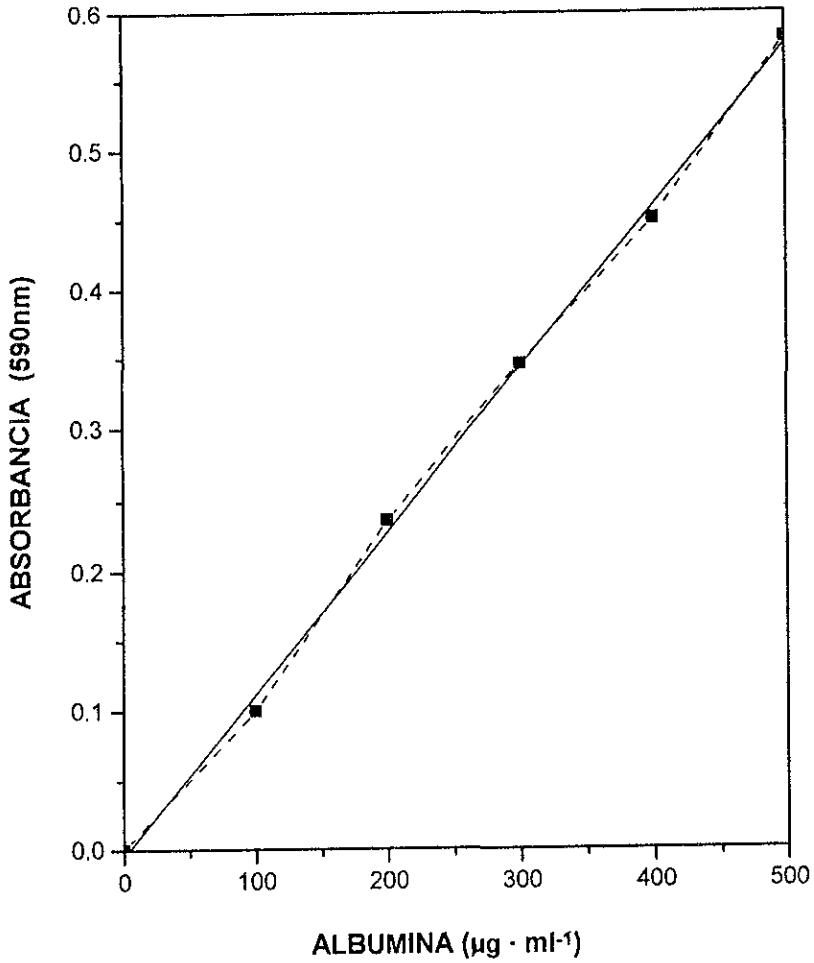
Para la determinación de proteína se colocaron en tubos de ensayo 0.3ml de filtrado enzimático ya dializado, 0.7ml de agua destilada y 5ml del reactivo D, compuesto por una parte de CuSO₄ al 1% en agua, una parte de tartrato de sodio y potasio al 2% en agua y 50 partes de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N; se agita vigorosamente y se deja reposar por 10 minutos. Se agregan 0.5ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido en agua destilada 1:1, se agita y se deja reposar 30 minutos. Posteriormente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm

(Spectrònic 21D), y se interpola en una curva standar de albùmina sèrica bovina (Gràfica 1).

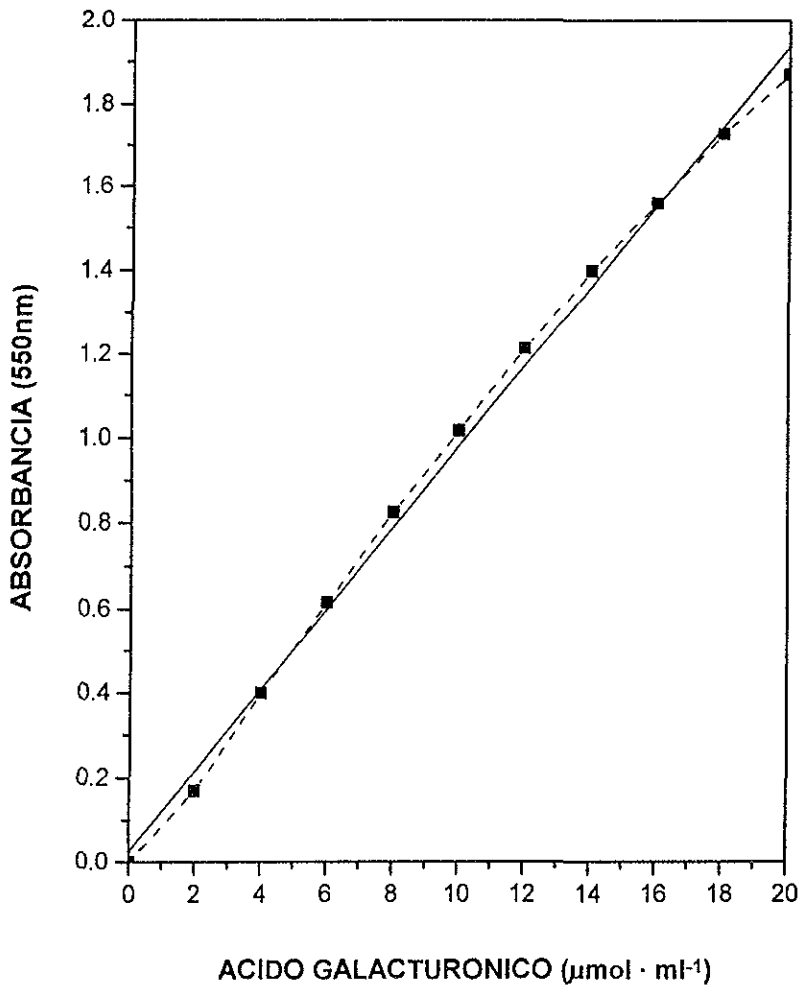
DETERMINACION DE GRUPOS REDUCTORES EN EL MEDIO DE CULTIVO

Sé determinó la concentraciòn de grupos reductores en los filtrados libres de cèlulas por el mètodo del DNS (Miller, 1959). El cual es un ensayo colorimètrico, que se fundamenta en una reacciòn oxido- reducciòn, en donde el color aparece por la reducciòn del àcido 3,5- dinitrosalicílico a àcido 3-amino,5-nitrosalicílico, por el grupo aldehído de los compuestos reductores presentes en el medio. El ensayo se llevó acabo en tubos de 16X150mm, a los cuales se les agregó 1.5ml de soluciòn amortiguadora de acetatos 0.17M, pH=5, 3ml del reactivo de DNS¹ y 0.5ml del filtrado enzimàtico. La mezcla sé hirviò 5 min. en baño de agua y posteriormente se adicionaron 15ml de agua destilada. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Bausch y Lomb Spectronic 21D). La concentraciòn de grupos reductores se calculó interpolando la absorbancia del problema en una curva estàndar de àcido galacturónico (Gràfica 2)

¹ El reactivo se preparó agregando NaOH al 1.4% (p/v), ac 3,5-dinitrosalicílico 0.75% (p/v), tartrato de sodio y potasio 10.0% (p/v), Fenol 0.54% (p/v) y metabisulfito de sodio 0.59% (p/v)



GRAFICA1. CURVA ESTANDAR DE ALBUMINA SERICA BOVINA (- ■ -).
AJUSTE DE LA CURVA POR REGRESION LINEAL (—)



GRAFICA 2. CURVA ESTANDAR DE ACIDO GALACTURONICO (- ■ -),
AJUSTE DE LA CURVA POR REGRESION LINEAL (—).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD PECTINOLITICA ENDO-P POR *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Aspergillus sp. CH-Y-1043 es un hongo pectinolítico aislado en nuestro laboratorio que produce endopectinasas extracelulares y debido a que el objetivo del presente estudio considera el uso de cáscara de limón como sustrato para la producción de endopectinasas (endo-P) extracelulares, en primer lugar fue evaluada la producción de la actividad de estas enzimas utilizando diferentes sustratos: cáscara de limón, pectina y ácido galacturónico (AG), con el fin de establecer los perfiles de producción de estas actividades. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 1**. En la **Figura 1A** se observa que existe una gran diferencia en la producción de las actividades enzimáticas entre los sustratos utilizados. En esta figura se puede observar que la actividad se incrementa muy rápidamente durante las primeras 24 horas de incubación en cáscara de limón, hasta alcanzar un máximo de 6.7 U ml^{-1} a las 111 horas. Cuando pectina es la fuente de carbono, la actividad de endo-P se incrementa más lentamente, casi de manera lineal hasta las 111 horas, donde alcanza una actividad de 3.5 U ml^{-1} . Por el contrario, en AG se observa prácticamente cero de actividad. Estos resultados indican que existió un aumento de casi el 100 % en la producción de endo-P, si comparamos los datos obtenidos con cáscara de limón y pectina como sustratos. El que no haya actividad en ác. galacturónico puede deberse a varias alternativas, una de ellas es que no sea un inductor de la síntesis de las pectinasas y otra es que la alta concentración afecte negativamente la síntesis de las enzimas.

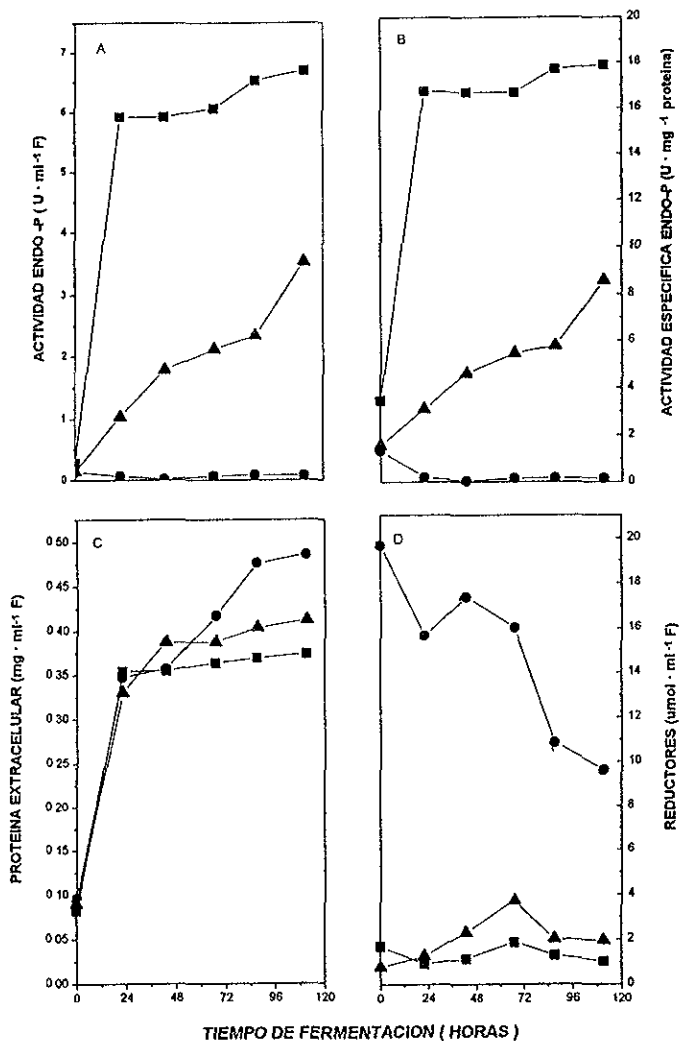


FIGURA 1. Producció de la activitat endo-pectinòlítica extracel·lular en diferents fonts de carboni al 1%. AG (—●—), pectina (—▲—); càscara de llimó (—■—). Activitat endo-P (A); activitat específica endo-P (B); proteïna extracel·lular (C); concentració de grups reductors en el medi (D). El cultiu es realitzà en matracs de 500 ml conteniendo 200 ml del medi de producció: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.4%; KH_2PO_4 al 0.05%; y K_2HPO_4 al 0.05%, todos a pH de 2.8. Los matracs fueron incubados a 37°C y 200 r.p.m.

Debido a que la cáscara es un desecho no soluble que permanece sólido hasta el final de la fermentación, fue difícil medir el crecimiento del hongo, por lo que se decidió medir la proteína extracelular, la cual de cierta manera es un reflejo del crecimiento, ya que entre más crecimiento mayor concentración de proteína extracelular. De tal forma, la producción específica mostrada en la **Figura 1B** se calculó dividiendo la producción volumétrica entre la concentración de la proteína extracelular. Los resultados en esta figura muestran que los perfiles de producción específica tienen un comportamiento similar al de la actividad volumétrica (**Figura 1A**). La producción de proteína extracelular en los tres sustratos es mostrada en la **Figura 1C** y se puede observar que la proteína extracelular se incrementa durante las primeras 24 horas y que en el caso de *ác. galacturónico* sigue aumentando hasta las 111 horas aunque con una velocidad menor. El perfil obtenido es muy similar al de una curva de crecimiento. En esta misma Figura se puede observar que cuando se cultiva el hongo sobre AG se obtiene una producción de proteína extracelular máxima de 0.49mg de proteína ml^{-1} a las 111h de fermentación, mientras que si utilizamos pectina como sustrato la proteína extracelular es de 0.41 mg ml^{-1} y con cáscara de limón de 0.37 mg ml^{-1} . Estos resultados sugieren que el microorganismo presenta un crecimiento mayor cuando es cultivado sobre AG, después en pectina y el crecimiento más bajo en cáscara de limón. Esto muy probablemente se debe a que los sustratos poliméricos deben primero ser hidrolizados para generar *ác. galacturónico*, el cual posteriormente es asimilado.

En cuanto a los grupos reductores presentes en el medio de cultivo (**Figura 1D**) se puede observar que cuando se utilizó AG como fuente de carbono, hay una disminución de grupos reductores conforme aumenta el tiempo de fermentación

hasta llegar a $9,5 \mu\text{mol ml}^{-1}$ de reductores a las 111 h debido a que como es la única fuente de carbono, ésta se está consumiendo conforme el microorganismo crece. Por otro lado, cuando se cultiva el hongo con pectina, el perfil de acumulación de grupos reductores presenta un comportamiento ascendente alcanzando $4,0 \mu\text{mol ml}^{-1}$ a las 67 h para disminuir posteriormente a $2 \mu\text{mol ml}^{-1}$ transcurridas 111 h de fermentación. Utilizando cáscara de limón se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente con la diferencia que existe una menor acumulación de grupos reductores, $1,8 \mu\text{mol ml}^{-1}$ a las 67 h y $1 \mu\text{mol ml}^{-1}$ a las 111 h. Estos datos confirman que existe una correlación entre la producción de endopectinasas en los tres sustratos utilizados y la cantidad de reductores en el medio, ya que anteriormente fue reportado que *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 presenta represión catabólica de endo-pectinasas por acumulación de productos resultado de la degradación de la pectina que son evaluados como grupos reductores (Aguilar y Huitrón, 1986), por eso existe una mayor producción de endo-P cuando se cultiva al hongo sobre cáscara de limón en comparación a cuando se cultiva en pectina ó AG. Por otro lado la producción de la actividad endo-P, cuando utilizamos AG como única fuente de carbono, es nula debido a que este sustrato como tal es uno de los productos de la degradación de la pectina y el que forme parte del medio de fermentación a una concentración relativamente alta influye de manera negativa en dicha producción, aunque existe la posibilidad de que no haya producción de enzima porque el ác. galacturónico no actúa como inductor. Otros estudios realizados con *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, han demostrado que cuando se utiliza AG como fuente de carbono, la producción de enzimas pécticas extracelulares es muy baja (Pérez, 1996).

Adicionalmente en nuestro laboratorio se ha observado que *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 produce una actividad exo-pectinolítica (exo-P) en las esporas que es constitutiva, ya que la presenta aún cuando se cultiva en glucosa, fructosa, sacarosa ó glicerol. También se ha detectado que cuando se cultiva la cepa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 en fermentación sumergida con AG como fuente de carbono se produce mayor actividad extracelular de exo-P en comparación a cuando se cultiva al hongo en los sustratos antes mencionados (Aguilar y Huitrón, 1990).

EFFECTO DE LA ADICION DE AG A DIFERENTES TIEMPOS DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE ENDO-P

El ácido galacturónico es uno de los productos finales de la degradación de pectina y se ha reportado que puede causar represión catabólica de las enzimas pécticas (Aguilar y Huitrón, 1986), pero también se ha demostrado que este compuesto puede estimular la producción de la actividad de endo-pectinasas extracelulares en *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 cuando es cultivado en pectina. Por eso con el objeto de establecer si el AG presenta un efecto estimulador de la producción de dichas enzimas, cuando se cultiva al hongo en cáscara de limón, fue evaluada la producción de la actividad endo-P adicionando una concentración fija de AG al medio de fermentación, a diferentes tiempos de cultivo. Los tiempos elegidos para la adición del AG fueron 0, 12, 18, 24, y 36 horas y la concentración de AG de 1.0 mg ml^{-1} , la cual ya había sido probada en cultivos con pectina.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2**, en donde se observa la actividad endo-P producida durante el curso de la fermentación. En todos los casos cuando se adicionó el AG existe una mayor producción de la actividad endo-P transcurridas 107 h, con respecto al control (sin adición de AG). En el caso en que la adición, se realizó a las 0 h y 12 h de fermentación, el incremento en la actividad se observa después de las 68 y 88 h respectivamente. Antes de este tiempo se encuentra por debajo del control. Un comportamiento similar se muestra cuando se adicionó el AG a las 18 h, con la diferencia de que la producción solo

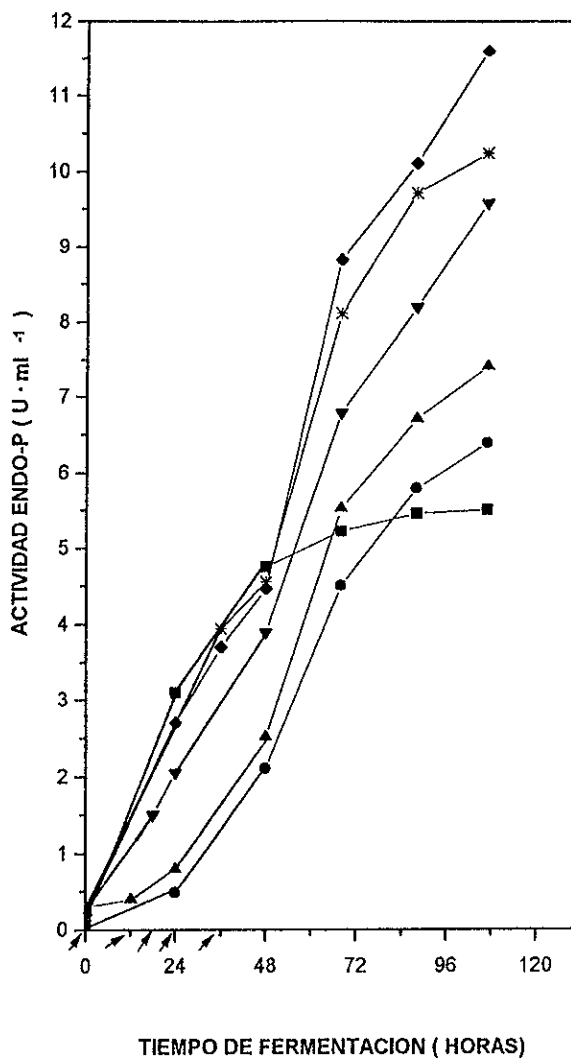


FIGURA 2. Efecto de la adición de AG a diferentes tiempos de fermentación sobre la producción endo-pectinolítica extracelular en *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 1% y pH de 2.8, en las condiciones descritas en la Figura 1. Control, sin adición de AG (—■—), con adición de AG 1.0 mg ml⁻¹ a las 0 horas (—●—); a las 12 horas (—▲—); a las 18 horas (—▼—), a las 24 horas (—◆—), a las 36 horas (—✱—). Las flechas indican el tiempo al que se adicionó el AG

permanece por debajo del control hasta las 48 h, después de este tiempo se incrementa. Estos resultados indican que la presencia de AG a tiempos cortos de fermentación, de 0 h a 18 h, afecta negativamente la producción de endopectinasas extracelulares, aunque a las 107 h la actividad está por arriba del control. En lo que respecta al tiempo de adición de 24 h y 36 h se observa un aumento considerable en la producción de la actividad después de 12 y 24 horas en que se realiza la adición de AG. La mayor producción de esta actividad se observa cuando la adición se realiza a las 24 h de fermentación en donde se alcanza un incremento de aproximadamente el 100% con respecto a cultivos donde no se adicionó AG. Estos resultados también se pueden observar en la **Figura 3 y 4**, en donde se aprecia más claramente el efecto de cada adición sobre la producción de la actividad y la cantidad de grupos reductores durante el transcurso de la fermentación. Hay que resaltar que el GA se consume muy rápidamente durante las siguientes 12 horas después de la adición, para después disminuir más lentamente

En la **Tabla 1** (pag. 41) se comparan las producciones máximas de endopectinasas extracelulares a los diferentes tiempos de adición del AG. Como se puede observar todas las actividades se encuentran por arriba del control, pero el mayor porcentaje de producción, con respecto a éste, es cuando el AG es adicionado a las 24 h de fermentación (210%). Posteriormente cuando se adiciona a las 36 h (185%), luego a las 18 h (173%), y finalmente cuando se adiciona a las 12 h y 0 h (134% y 115%) respectivamente.

TABLA 1 PRODUCCION MAXIMA DE ENDO-PECTINASAS EXTRACELULARES A DIFERENTES TIEMPOS DE ADICION DE AG

TIEMPO DE ADICIÓN DEL AG (1mg ml^{-1})	ACTIVIDAD ENDO-P (U ml^{-1})	PRODUCCIÓN RELATIVA (%)
CONTROL (sin adición)	5.51	100
0 horas	6.38	115
12 horas	7.40	134
18 horas	9.57	173
24 horas	11.60	210
36 horas	10.23	185

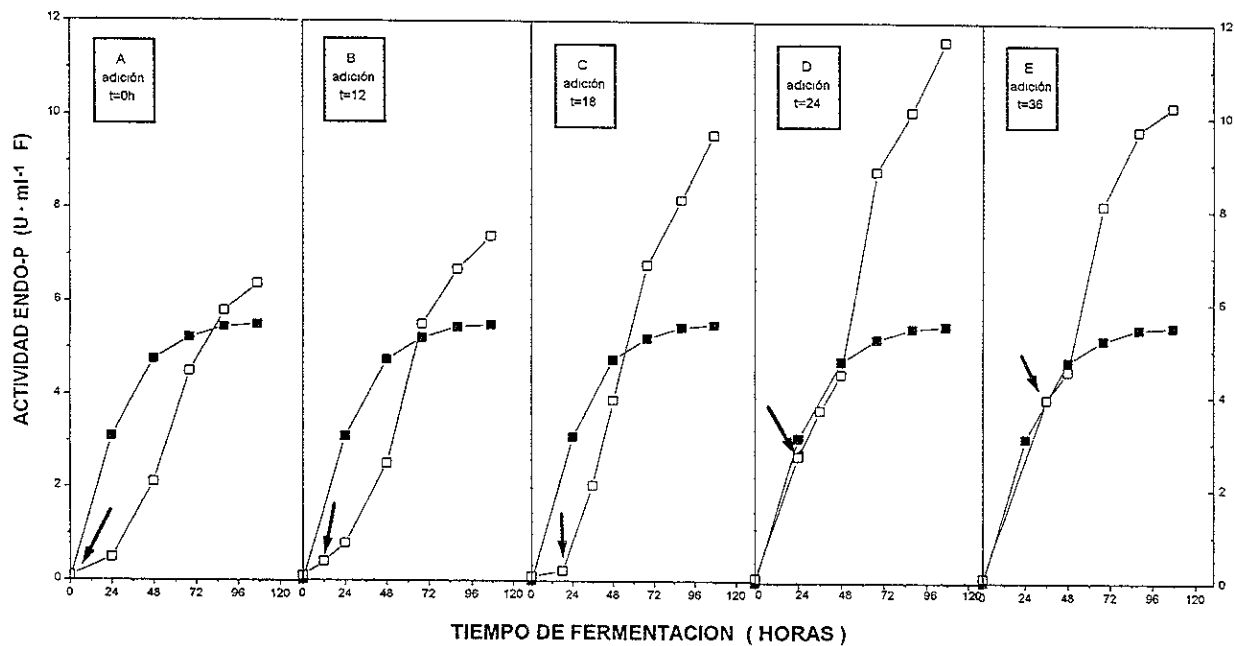


FIGURA 3. Efecto de la adición de AG a diferentes tiempos sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica. Con adición de AG 1.0 mg·ml⁻¹ a las 0 horas (A), a las 12 horas (B); a las 18 horas (C); a las 24 horas (D); y a las 36 horas (E), Control, sin adición de AG (—■—); con adición de AG (—□—). La flecha indica el tiempo en que se adicionó el AG.

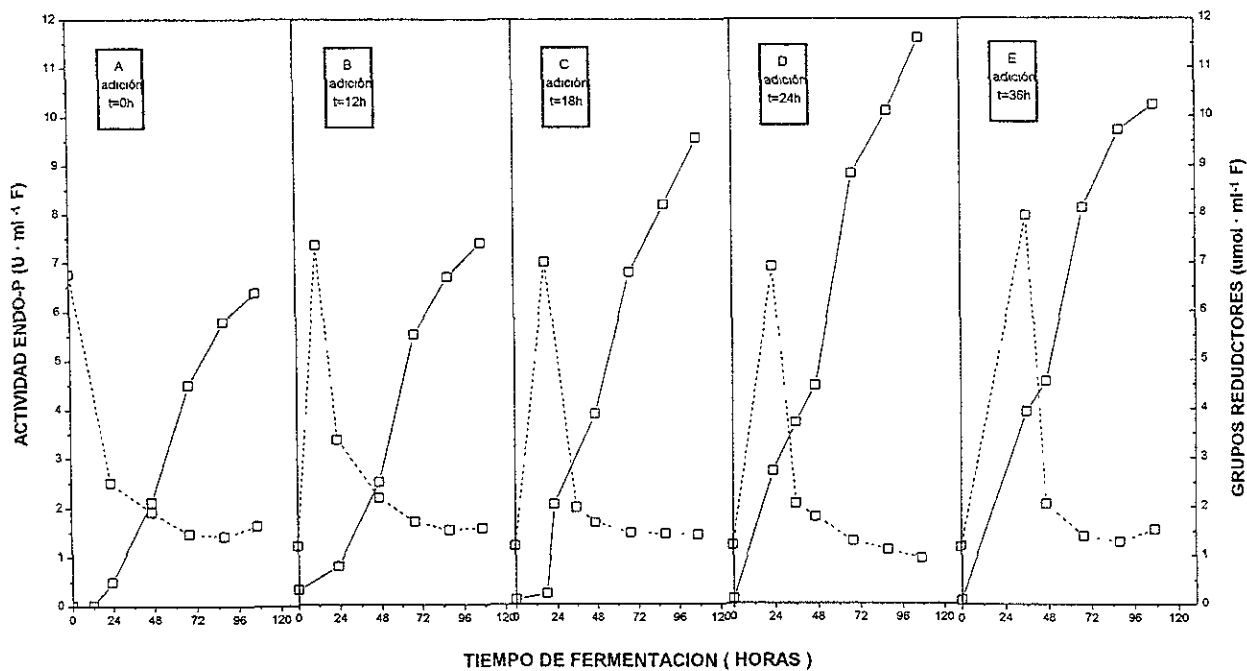


FIGURA 4. Efecto de la adición de AG a diferentes tiempos sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica extracelular y la cantidad de grupos reductores en el medio de fermentación por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 1% en las condiciones descritas en la Figura 1. Adición de AG 1mg·ml⁻¹ a las 0 horas (A), a las 12 horas (B), a las 18 horas (C) a las 24 horas (D); y a las 36 horas (E). Actividad endo-P (—□—); grupos reductores (··□··).

Si bien se encontró que existe mayor producción de la actividad endo-P cuando se adiciona AG al medio de fermentación y que la máxima se encuentra cuando es adicionado a las 24 h, no sabemos si el incremento en la producción es debido a una estimulación de la producción de la actividad, ó a un mayor crecimiento del microorganismo. Sin embargo nos puede ayudar a comprender que sucede el obtener la producción específica en el tiempo y compararla con la producción volumétrica, ya que la producción específica es una relación entre las unidades de actividad y el crecimiento en biomasa ó proteína extracelular.

Los resultados se muestran en la **Figura 5** en donde se compara la actividad específica de endo-pectinasas extracelulares a los diferentes tiempos en que se adicionó el AG. Se observa un comportamiento similar al descrito en la **Figura 3** pues se nota claramente un incremento en la producción específica de estas enzimas, cuando el AG es adicionado a las 12, 18, 24 y 36 horas. La estimulación en la producción específica es mayor o menor dependiendo del tiempo en que se añada el AG. La producción específica del control (sin adición de AG) a las 107 h de fermentación es de $12.5 \text{ U mg}^{-1}\text{proteína}$ (100%), mientras que cuando se adiciona AG a las 36 h es de $18.53 \text{ U mg}^{-1}\text{proteína}$ (148%), a las 24 h de $25.32 \text{ U mg}^{-1}\text{proteína}$ (203%), a las 18 h de $18.8 \text{ U mg}^{-1}\text{proteína}$ (150%) y a las 12 h de $14.9 \text{ U mg}^{-1}\text{proteína}$ (120%). No se observa estimulación cuando la adición se realiza las 0 h.

Estos resultados indican que hay una mayor actividad pectinolítica sin que haya un incremento en el crecimiento, tomado éste como la producción de proteína extracelular (**Figura 6**). En esta figura también se observa que los valores de proteína a las 107 horas son muy parecidos; por lo tanto los resultados

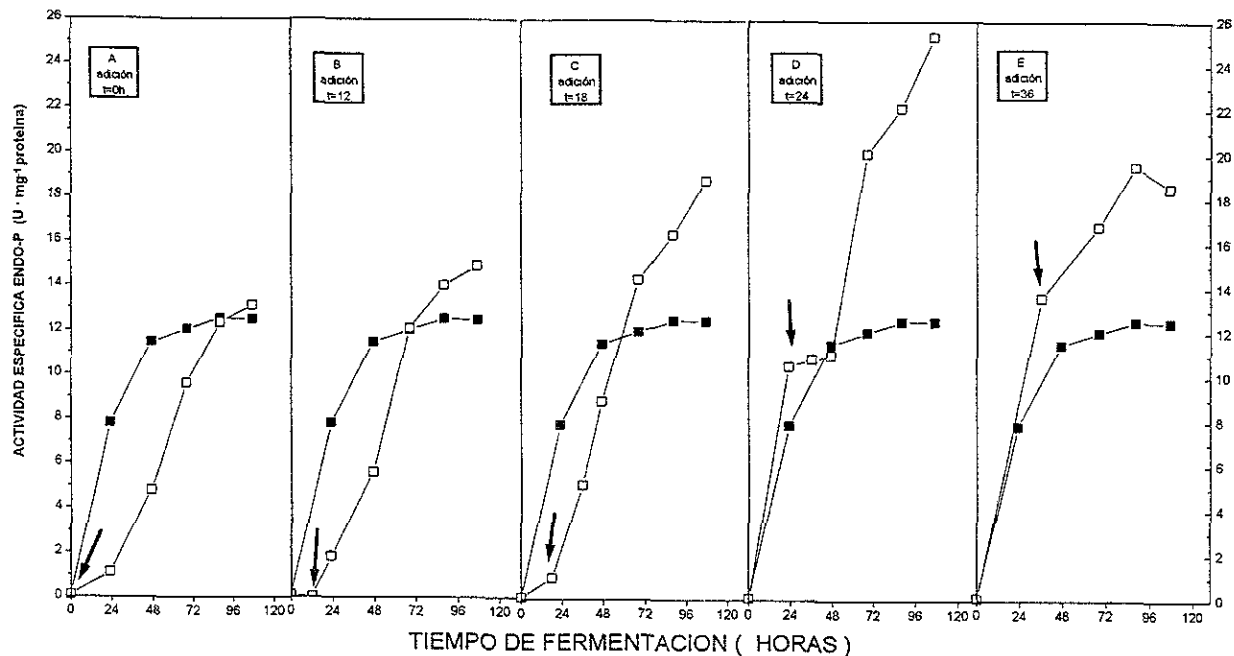


FIGURA 5 Efecto de la adición de AG a diferentes tiempos sobre la producción específica endo-pectinolítica extracelular por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 1% en las condiciones descritas en la Figura 1. Con adición de AG a las 0 horas (A); a las 12 horas (B), a las 18 horas (C); a las 24 horas (D), y a las 36 horas (E). Control sin adición de AG (—■—); con adición de AG 1.0 mg ml⁻¹ (—□—). La flecha indica el tiempo en que se adiciono el AG.

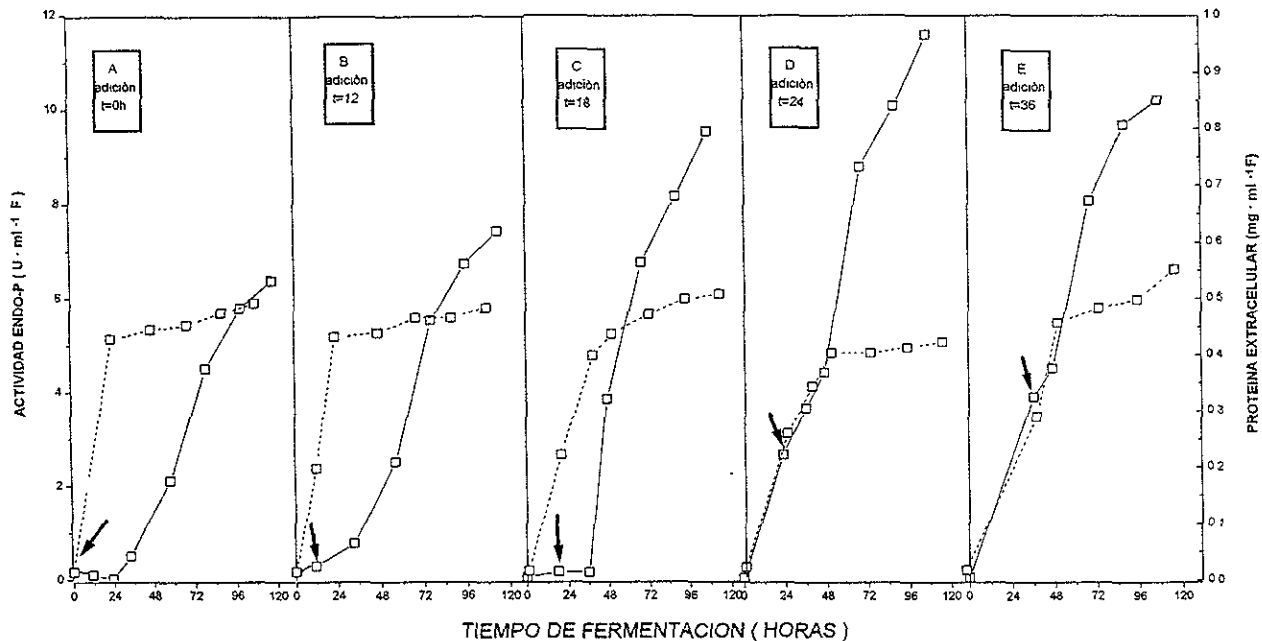


FIGURA 6. Efecto de la adición del AG a diferentes tiempos sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica extracelular y de la proteína extracelular de *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 1%, en las condiciones descritas en la Figura 1. Adición de AG 10 mg·ml⁻¹ a las 0 horas (A); a las 12 horas (B); a las 18 horas (C); a las 24 horas (D); y a las 36 horas (E). Actividad endo-P (—□—), proteína extracelular (- - □ -). Las flechas indican el tiempo en que se realizó la adición.

obtenidos indican una mayor producción de la actividad pectinolítica por efecto de la adición de AG, que puede ser debida a una estimulación ó a una inducción.

En este sentido, un aspecto que sería interesante conocer es, si el efecto estimulador del AG es específico ó se podría lograr con otra molécula pequeña metabolizable, como es el monosacárido glucosa (Glu). Con este fin se adicionó glucosa a las 0, 12, 18, 24, y 36 horas a un cultivo de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 manteniendo las mismas condiciones experimentales que en el estudio con AG. Los resultados de producción específica se muestran en la **Figura 7**, en donde se observa que en todos los tiempos en que se adicionó la Glu, la actividad de endo-P está por debajo del control, lo cual indica que el efecto del ác. galacturónico si es específico de este compuesto y que participa en una inducción ó estimulación de la actividad endo-pectinolítica. Por otro lado, los resultados indican que puede existir represión de la producción de enzimas ejercida por la glucosa y que esta represión se muestra de mayor a menor grado conforme aumenta el tiempo en que fué adicionada la Glu.

Este fenómeno de estimulación de la producción de endo-P se ha observado en estudios previos, donde la cepa de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 se cultivó en pectina y los resultados indicaron que existió estimulación en la producción específica de endo-P, cuando se adiciona AG a las 24 h de fermentación (Aguilar y Huitrón, 1987). En este caso no se evaluó la adición del AG a otros tiempos de fermentación, lo cual no permitió contar con mas información en cuanto al rango de tiempo de adición de AG sobre el efecto en la producción específica de la actividad endo-P cuando el microorganismo es

cultivado en pectina. En este mismo sentido, también se ha observado que el AG a una concentración final de 1.0 g ml^{-1} , adicionado a las 24 h de fermentación estimula la producción de endo-P en *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, cultivado en cáscara de limón, dicha estimulación fue alrededor del 170% con respecto al control (Pérez, 1996).

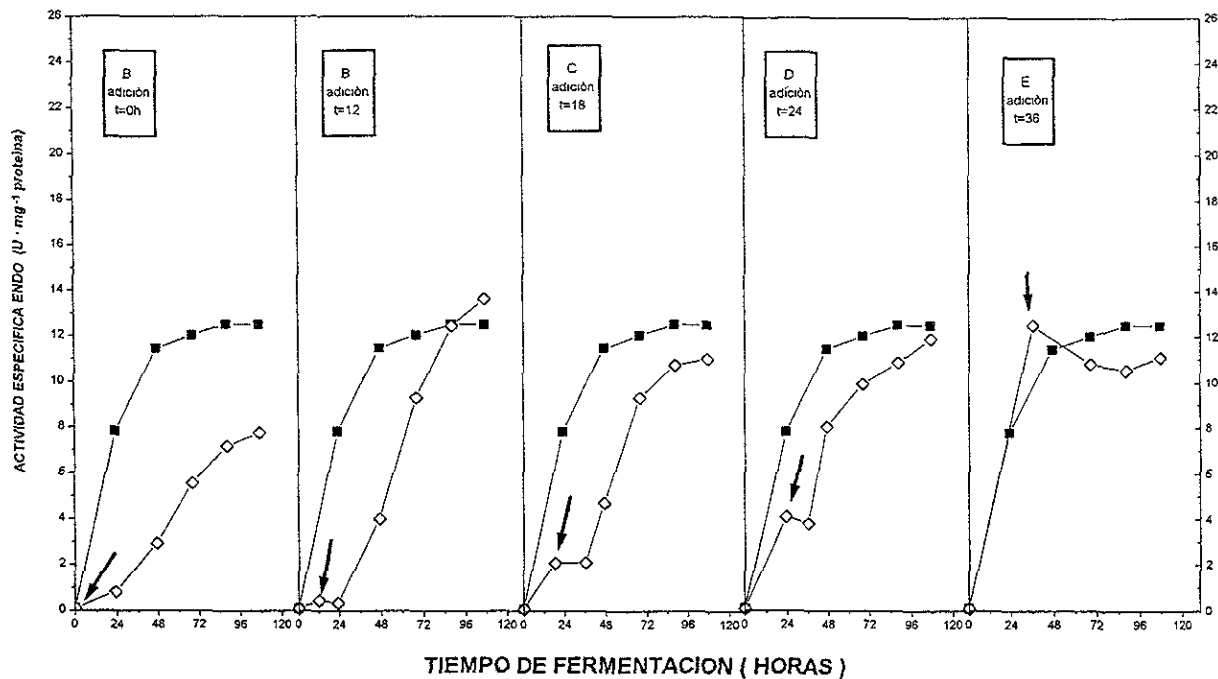


FIGURA 7. Efecto de la adición de glucosa (Glu) a diferentes tiempos sobre la producción específica de endo-pectinasas extracelulares por *Aspergillus* sp CH-Y-1043 cultivado en cáscara de limón al 1%, en las condiciones descritas en la Figura 1. Con adición de Glu 1.0 mg ml⁻¹ a las 0 horas (A); a las 12 horas (B), a las 18 horas (C); a las 24 horas (D); y a las 36 horas (E). Control sin adición de Glu (—■—); con adición de Glu 1.0 mg·ml⁻¹ (—◇—). Las flechas indican el tiempo al que se adicionó la Glu.

**EFFECTO DE LA ADICION DE AG A DIFERENTES
CONCENTRACIONES
EN LA PRODUCCION DE ENDO-P.**

Una vez conocido el tiempo mas adecuado para adicionar el AG y estimular la producción de endo-P, se evaluó el efecto del ác. galacturónico utilizando una concentración diez veces menor de AG, es decir 0.1 mg ml^{-1} . En caso de conservarse el efecto estimulador de la misma magnitud sería interesante porque se disminuiría el efecto negativo (por represión catabólica) y además la cantidad de AG utilizada.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8**. En el **panel A** se compara la producción de la actividad endopectinolítica cuando se adiciona AG a las dos concentraciones señaladas y se observa una menor estimulación de la producción de estas enzimas cuando la concentración de AG es de 0.1 mg ml^{-1} en comparación a cuando se adiciona 1.0 mg ml^{-1} . En estas condiciones de baja concentración de AG se obtiene un incremento de la producción del 16% con respecto al control.

En la **Figura 8B** se comparan las producciones específicas de endo-P a las diferentes concentraciones de AG y se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente, debido a que el hongo produce cantidades parecidas de proteína extracelular, independientemente de que se adicione 0.1 mg ml^{-1} o 1.0 mg ml^{-1} de AG como se muestra en la **Figura 8D**. Los valores de producción específica de la actividad endo-P a las 120 h de fermentación cuando la

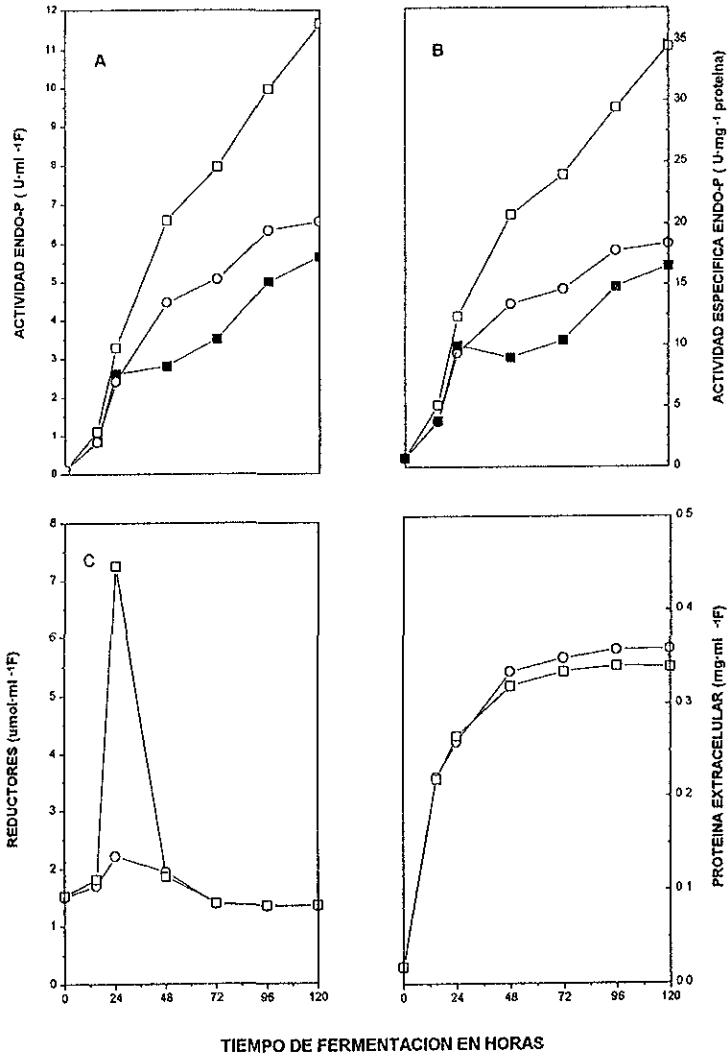


FIGURA 8. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de AG a las 24 horas, sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica extracelular por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en las condiciones descritas en la Figura 1 Actividad endo-P (A); actividad específica endo-P (B); grupos reductores (C); proteína extracelular (D) Control, sin adición de AG (—□—); con adición de 0.1 mg·ml⁻¹ de AG (—○—); con adición de 1.0 mg·ml⁻¹ de AG (—■—).

concentración de AG es 1.0 mg ml^{-1} fue de 34.46 U mg^{-1} proteína, que corresponde a un porcentaje de estimulación de 109% con respecto al control y si la concentración es de 0.1 mg ml^{-1} , la producción de la actividad es 18.34 U mg^{-1} proteína y la estimulación de 11% en relación al control.

Por otro lado, los grupos reductores en el medio durante el transcurso de la fermentación se muestran en la **Figura 8C** en donde se observa que después de adicionar el AG a una concentración de 1.0 mg ml^{-1} , hay una disminución rápida de reductores hasta alcanzar una cantidad constante de las 72 h hasta las 120 h de cultivo. Un perfil parecido se observa cuando se adiciona 0.1 mg ml^{-1} de AG, con la diferencia de que la concentración de grupos reductores es menor.

Los resultados obtenidos indican que, si bien se presenta un efecto estimulatório en la producción de la actividad de endo-P extracelulares, cuando se adiciona una concentración diez veces más baja de AG, este efecto es menor y no se compara con el encontrado a una concentración de 1.0 mg ml^{-1} .

PRODUCCION DE ENDO-P A DIFERENTES VALORES DE pH INICIAL CUANDO SE ADICIONA AG A LAS 24 HORAS

Posteriormente con el fin de observar si había posibilidad de mejorar aún más la producción de la actividad endo-P, se modificaron algunas condiciones del medio de fermentación como el pH inicial, la concentración de cáscara de limón y la cantidad de inóculo. En primer lugar se modificó el pH inicial (pHi) del medio. Se eligieron 5 valores 2.6, 2.8, 3.5, 4.5 y 5.5 entre los cuales, el pHi de 2.8 ya había sido utilizado en los experimentos anteriores de este trabajo y por lo tanto será utilizado como control (referido como 100 % de producción). Además, en otros estudios se encontró que utilizando cáscara de limón como fuente de carbono, el pHi de 2.8 fue el mejor valor para para incrementar la producción endo-pectinolítica (Larios, et al., 1989).

Los resultados obtenidos del efecto de la adición del AG (1.0 mg ml^{-1}) sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica a los diferentes pHi utilizados se muestran en la **Figura 9**. En la **Figura 9A** se observa que el mejor pHi para la producción de estas enzimas es, sin duda el de 2.8, ya que por debajo o por arriba de este pH la producción de la actividad fue considerablemente menor. Cuando el pHi es de 2.6, 3.5 y 4.5 el perfil de producción de la actividad endo-P es similar. De hecho la producción a las 120 horas de fermentación con respecto al control es de 24% si el pHi es 2.6; 28.6% si es de 3.5 y 14.7% cuando el pHi es 4.5. Por otro lado cuando el pHi se ajustó a 5.5 la producción de endo-pectinasas extracelulares fue prácticamente nula durante las primeras 48 h de fermentación; posteriormente se nota un ligero incremento de las 48 a las 72 h para descender posteriormente a una producción de 0.5% a las 120 h de fermentación.

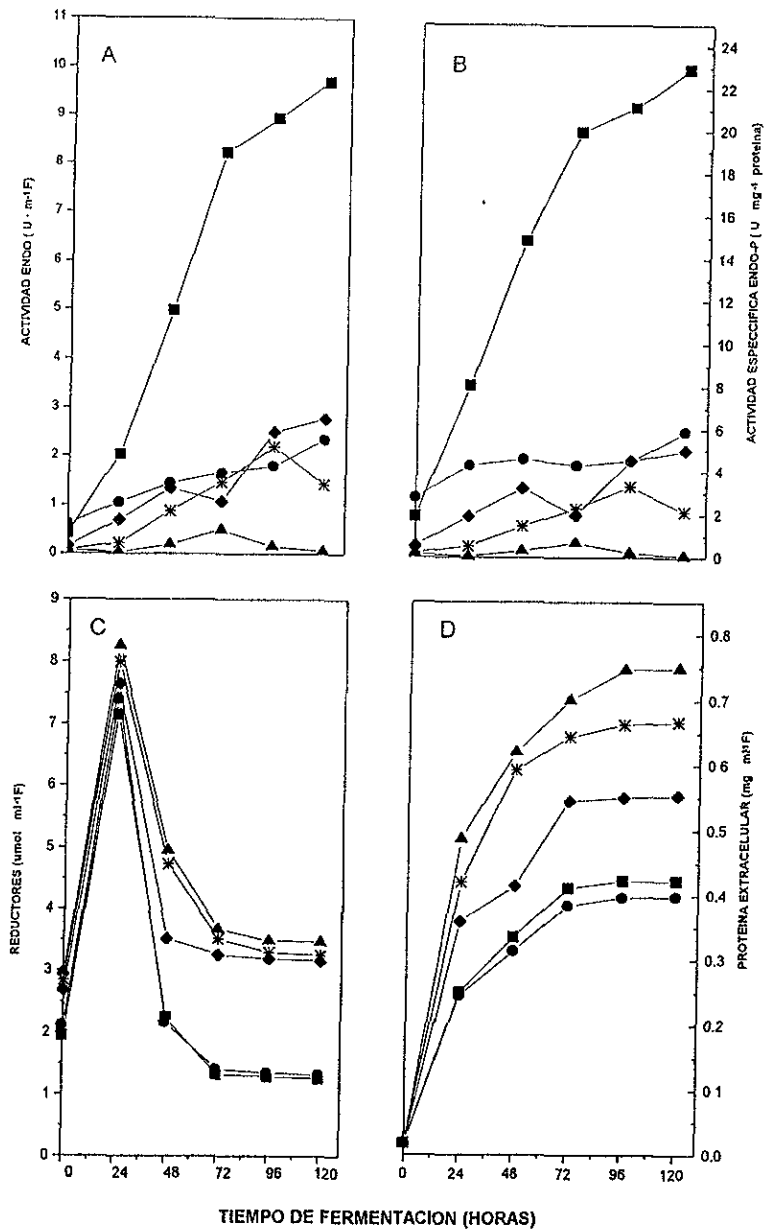


FIGURA 9. Producción de endo-pectinasas a diferentes pH's iniciales cuando se adiciona AG (1mg ml⁻¹) a las 24 horas de fermentación, en cultivos de *Aspergillus* sp CH-Y-1043, desarrollado en las condiciones descritas en la Figura 1. Actividad endo-pectinoltica (A); actividad específica endo-pectinoltica (B); grupos reductores (C); proteína extracelular (D). pHi de 2.6 (—●—); pHi de 2.8 (—■—); pHi de 3.5 (—◆—); y pHi de 4.5 (—*—); y pHi de 5.5 (—▲—).

En la **Figura 9B** se observa la producción específica de la actividad endo-P, donde se aprecia un perfil de producción muy similar al de la producción volumétrica entre los diferentes pH_i (**Figura 9A**), solo que la producción a las 120h de fermentación en los diferentes pH's es: 100.0% cuando pH_i es 2.8; 25.7% si es de 2.6; 21.8% cuando pH_i es de 3.5; 9.4% y 0.3% cuando el pH_i es 4.5 y 5.5 respectivamente. Estos resultados indican que el pH inicial del medio de cultivo tiene un papel muy importante en la producción de las endo-P, ya que en los otros pH usados ni siquiera se alcanzó la producción obtenida en condiciones sin adición de AG.

En cuanto a la cantidad de grupos reductores durante el transcurso de la fermentación a los diferentes pH's, éstos se muestran en la **Figura 9C**, y se observa que después de la adición del AG a las 24 horas de fermentación, hay una disminución de reductores que se mantiene hasta las 120 horas de cultivo. La disminución de grupos reductores es mayor a los pH_i más ácidos (2.6 y 2.8), que a los pH_i menos ácidos (3.5, 4.5, y 5.5), es decir la cantidad de reductores en el medio de fermentación, después de la adición del AG es menor a pH_i de 2.6 y 2.8 y mayor a pH_i de 3.5, 4.5, y 5.5. La relación de las diferencias en la cantidad de grupos reductores en el medio de cultivo durante la fermentación con la producción de endo-P y el crecimiento del hongo **Figura 9D**, no está muy claro pero se observa que a pH_i de 3.5, 4.5, y 5.5 tiene mayor concentración de grupos reductores y mayor crecimiento, de hecho los valores de proteína extracelular a las 120 horas de producción a pH_i de 2.6 y 2.8 es: 0.39 y 0.42 mg ml⁻¹ F, respectivamente y cuando el pH_i es de 3.5, 4.5, y 5.5 es de: 0.55, 0.66, y 0.75 mg ml⁻¹ F respectivamente. Los resultados muestran que la mayor producción y estimulación de la actividad endo-P es a pH_i de 2.8, y además que el rango de pH_i

donde se observa mayor producción de la actividad es muy estrecho, como se aprecia mas claramente en la **Figura 10**, donde se compara solamente, los resultados de la producción específica de la actividad endo-P a las 120 horas de cultivo.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con pectina como sustrato sin adición de AG muestran que *Aspergillus sp* CH-Y-1043, produce mayor actividad endo-P a pH de 3.5 y que la producción de la actividad es baja a valores de pH por arriba de 4.2, cuando se utiliza pectina con un grado de esterificación del 47% (Aguilar et al., 1991) El efecto del pH es mas fuerte en la producción de las endo-pectinasas que de las exo-pectinasas. Tambien se demostro que a pH de 3.5 se revela una banda de actividad que migra a una masa molecular de aproximadamente 43 kda, ésta banda no se detecto a pH de 4.2 y 5.2 (Aguilar et al., 1991).

Por otro lado, estudios utilizando cáscara de limón como sustrato demostraron que *Aspergillus sp* CH-Y-1043, produce mayor actividad endo-P extracelular, cuando se cultiva a pH de 2.75 que ha pH's mas altos ó más bajos (Larios et al., 1989). Este fenómeno es comparable con nuestros resultados, aunque es necesario aclarar que las condiciones de fermentación utilizadas en ese estudio fueron diferentes a las que utilizamos ademas, de que no se adicionò AG al medio de fermentación.

En otra especie de *Aspergillus* tambien se ha reportado que la mayor producción de la actividad de éstas enzimas es a pH's ácidos, un ejemplo de ello es *Aspergillus flavipes*, el cual produce mayor actividad endo-P a pH de 3.0 que a pH's más altos (Ortiz, 1991)

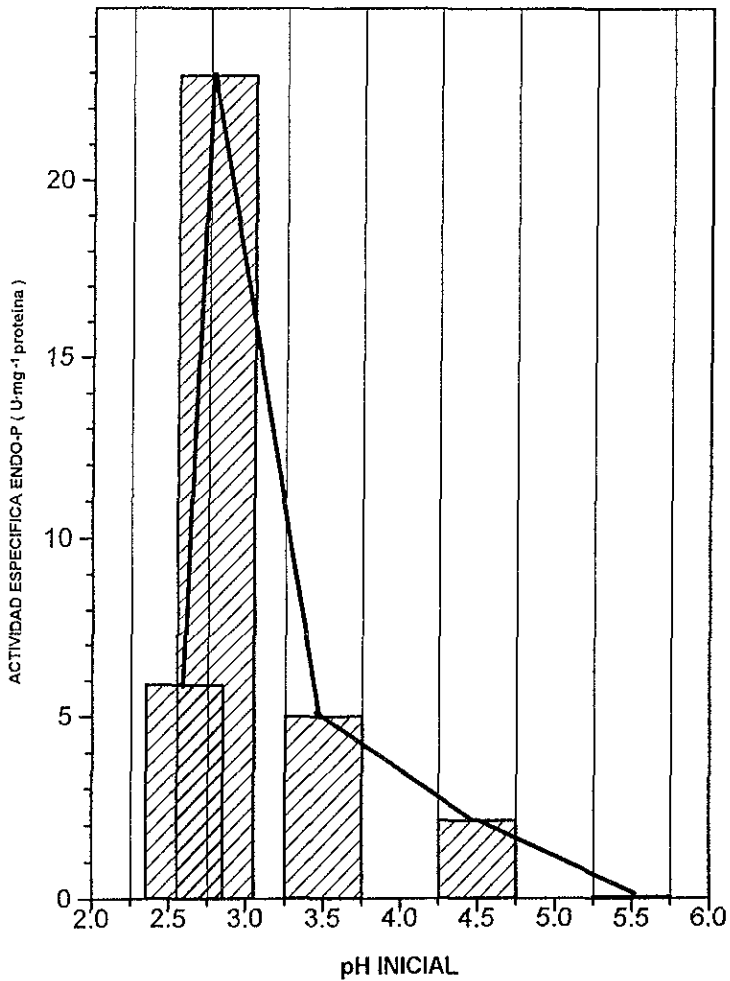


FIGURA 10. Producción específica, a las 120 horas de fermentación, de la actividad endo-pectinolítica extracelular a diferentes pH_i de fermentación, por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 1% y con adición de 1mg·ml⁻¹ de AG a las 24 horas. Cada barra indica la producción de la actividad a los distintos pH utilizados: 2.6, 2.8, 3.5, 4.5 y 5.5.

PRODUCCION DE ENDO-P VARIANDO LA CONCENTRACION DE CASCARA DE LIMON Y ADICIONANDO AG A LAS 24 HORAS

Se probó otra modificación consistente en la variación de la concentración de cáscara de limón (CL), buscando incrementar la producción de la actividad endo-P mediante la adición de AG a las 24 horas de fermentación. Las concentraciones de cáscara de limón probadas fueron 1% y 2%. En la **Figura 11**, se observa la producción de la actividad endo-P extracelular a las dos concentraciones de CL, tanto de los controles (sin adición de AG) como de los cultivos a los que se adicionó AG. En esta Figura se muestra que existe una mayor producción de la actividad endo-P con cáscara de limón al 2%, con o sin adición de 1.0 mg ml⁻¹ de AG. La producción a las 120 horas de fermentación en los cultivos sin adición de AG fueron 7 U ml⁻¹ F (**Figura 11A**) y 17 U ml⁻¹ F (**Figura 11B**) respectivamente, lo que indica un incremento en la producción a 254% al aumentar la cáscara de limón al 2%. Por otro lado, en los cultivos en donde se adicionó AG, la producción máxima que ocurrió a las 120 horas de fermentación y fue de 13.8 U ml⁻¹ F (**Figura 11A**) y de 28.3 U ml⁻¹ F (**Figura 11B**), es decir, se presenta un incremento de la actividad a 205% con cáscara de limón al 2% y adición de AG, en relación a los cultivos con cáscara al 1%; sin embargo si se toma como control (100%), la actividad producida inicialmente en cáscara al 1%, sin adición de AG, se obtiene un incremento de 400%, con cáscara de limón al 2% y adición de AG. Por otra parte hay que resaltar que la magnitud del efecto estimuladorio, por adición del AG, fue de 97% cuando la concentración de la cáscara de limón fue del 1% y del 66% cuando fue del 2%, lo que indica mayor estimulación cuando la CL se utiliza al 1%.

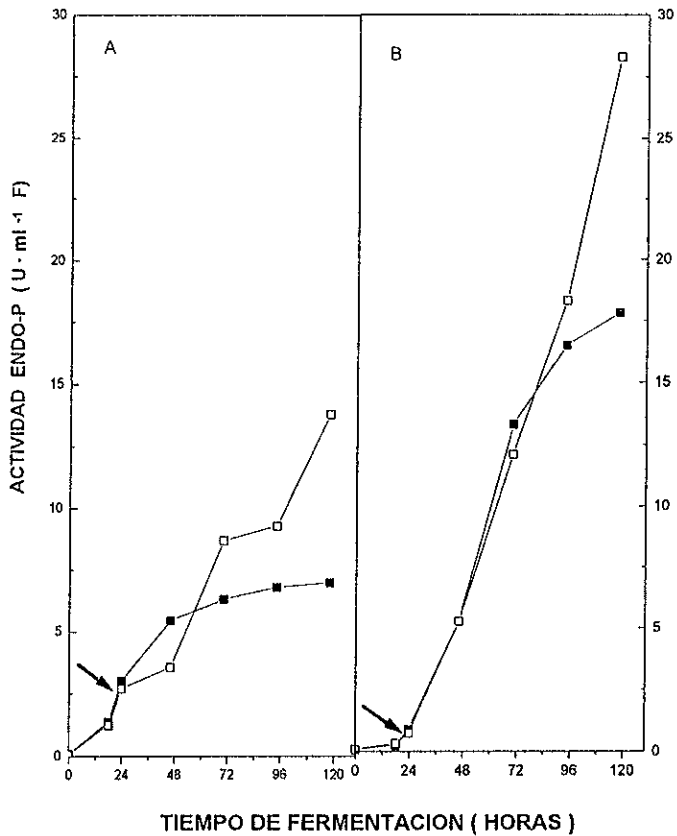


FIGURA 11. Efecto de la concentración de cáscara de limón sobre la producción de la actividad endo-pectinolítica cuando se adiciona AG (1.0 mg·ml⁻¹) a las 24h de fermentación. Cáscara de limón al 1% (A); al 2% (B). Control, sin adición de AG, (—■—), con adición de AG (—□—) La flecha indica el tiempo al que se adicionó el AG

También es importante señalar que cuando se utiliza el sustrato al 1% con adición de AG (**Figura 11A**), se observa, que la producción de la actividad aumenta por arriba del control (sin adición de AG) después de las 48 horas de fermentación, mientras que cuando se usa el sustrato al 2% (**Figura 11B**) el incremento de la producción se presenta hasta después de las 84 horas, es decir, la producción de la actividad cuando se adiciona AG al medio se incrementa a tiempos de fermentación más tempranos, con cáscara de limón al 1%. El incremento de la producción endo-P con CL al 2%, también se observa en la producción específica **Figura 12**, ya que el perfil de producción a las dos concentraciones de sustrato es parecido al de la producción volumétrica (**Figura 11**). Hay que mencionar el hecho de que la producción específica es mayor con CL al 2%, a pesar que a esta concentración, existe mayor crecimiento del hongo, pues la proteína extracelular es 53% más alta en relaciónal cultivo con 1% de CL (**Figura 13A**), lo cual indica, que si bien hay una contribución en la producción por crecimiento, también existe una estimulación en la producción de las enzimas por adición de AG. La producción específica a las 120 horas de fermentación con 1% de CL fue de 33.9 U mg^{-1} proteína y con 2%, de 45.4 U mg^{-1} proteína, lo que indica una estimulación en la producción específica a 134%, cuando se cultiva al hongo con 2% del sustrato, en comparación a cuando se cultiva con 1%.

En relación, a los grupos reductores durante el transcurso de la fermentación en estas condiciones, se observa en la **Figura 13B**, que el perfil de reductores es semejante entre ambas concentraciones de sustrato, por lo que se puede asumir que la concentración de cáscara de limón no influye en la cantidad de reductores generados por el microorganismo en el medio de fermentación.

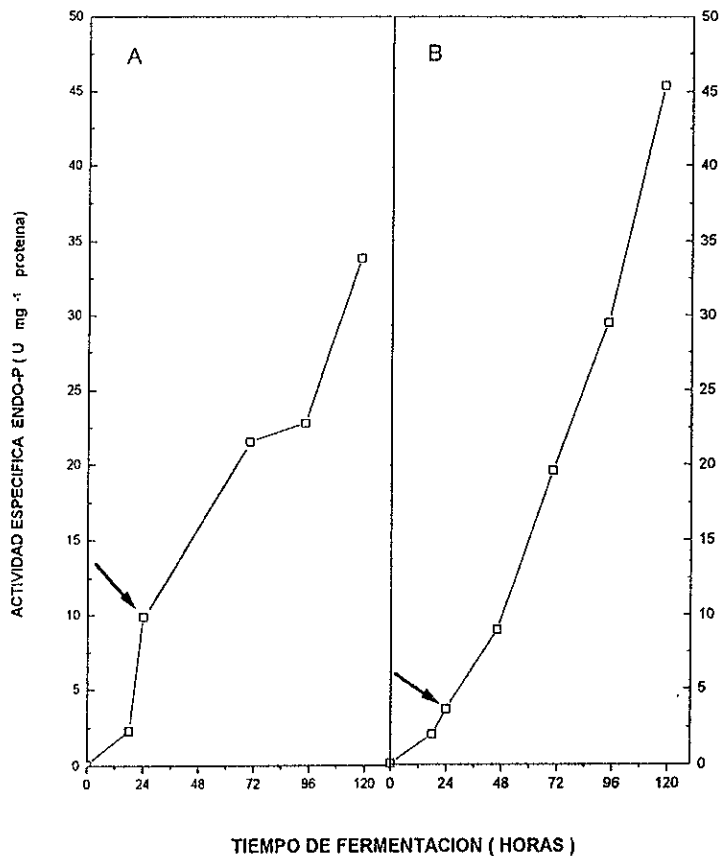


FIGURA 12 Producción específica de endo-P extracelulares durante la fermentación por *Aspergillus* sp CH-Y-1043 cultivado en càscara de limón al 1% y 2%, con adición de 1 0 mg·ml⁻¹ de AG a las 24 horas Càscara de limón al 1% (A); al 2% (B). La flecha indica el tiempo en que se adicionò el AG.

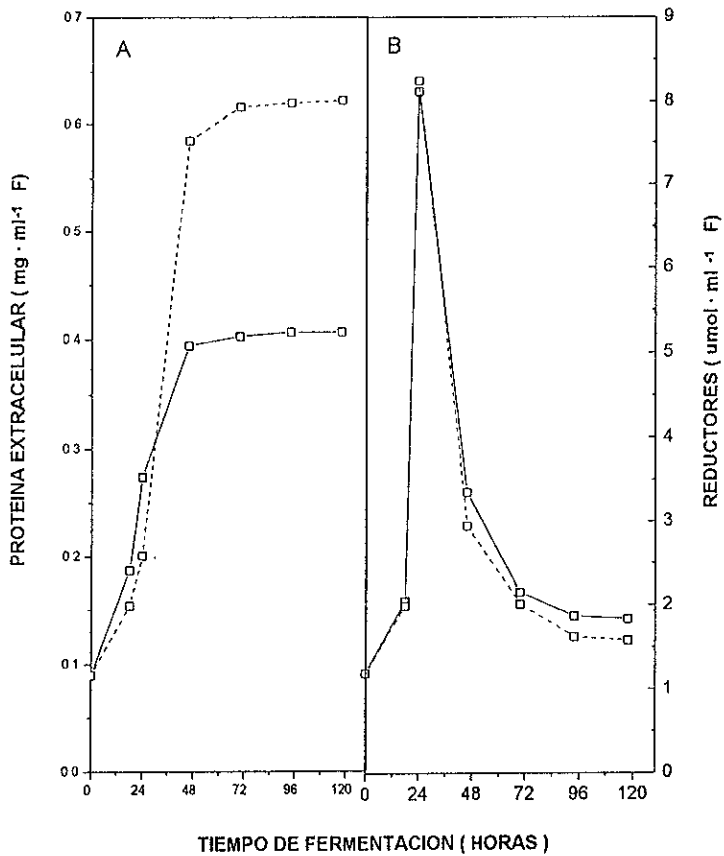


FIGURA 13. Variación de la proteína extracelular y de grupos reductores en el medio de fermentación con el tiempo, cuando se cultiva *Aspergillus* sp CH-Y-1043, en cáscara de limón 1% y 2%, con adición de AG (1.0 mg·ml⁻¹) a las 24 horas. Proteína extracelular (A), grupos reductores (B). Cáscara de limón al 1% (—□—); y al 2% (- - □ - -). Las condiciones de cultivo son las señaladas en la Figura 1.

En general, estos resultados sugieren dos cosas interesantes: 1) El efecto estimulador en la producción de la actividad endo-P por adición de AG se conserva al incrementar la concentración de CL al 2%, aunque no en la misma proporción; 2) Se logró obtener con la adición de AG y las modificaciones de las condiciones de cultivo hasta ahora realizadas, un incremento total a 400%, esto tomando en cuenta las unidades de enzima que se obtenían en las condiciones iniciales con CL al 1%, y sin adición de AG, lo que resulta muy interesante debido a que este fenómeno no sucede con sustratos purificados. La producción de endo-P cuando se cultiva al *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 en pectina al 1% es mayor que cuando se cultiva al 2% ó al 3%.

Estas diferencias en la producción de la actividad a concentraciones distintas de pectina y cáscara de limón se pueden deber a fenómenos de represión catabólica ejercida por el producto final de la hidrólisis de estos sustratos. Por lo tanto, la concentración de la fuente de carbono juega un papel muy importante, ya que una mayor acumulación de moléculas (2.0 umol ml^{-1} a las 120 h de fermentación) que resultan de la degradación de pectina, reprimen la producción de endo-P (Aguilar y Huitrón, 1987), lo que no ocurre cuando se cultiva al hongo en cáscara de limón (1.0 umol ml^{-1}). Por eso la importancia de esta fuente de carbono y la concentración de la misma para lograr una mayor producción de las enzimas deseadas.

PRODUCCION DE ENDO-P A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INOCULO CUANDO SE ADICIONA AG

Una vez obtenidas las condiciones donde se produjo la mejor actividad, se procedió a variar la concentración de inóculo para observar si se podía aumentar más el producto deseado. Por ésta razón se probó si la concentración de inóculo en el medio de fermentación tenía un efecto sobre la producción final de las endopectinasas. En este sentido se preparó una suspensión de esporas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 con una densidad óptica total (D.Ot) de cinco (ver materiales y métodos) de la que se tomaron diferentes volúmenes para inocular el medio de fermentación. Los volúmenes utilizados de esta suspensión fueron 1.0 ml, 2.0 ml y 4.0 ml por cada 100.0 ml de medio. La primera fue la utilizada en los experimentos anteriores.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**, en donde se compara la producción de la actividad endo-P a las diferentes concentraciones de inóculo utilizadas, cuando se cultiva al hongo en cáscara de limón al 2% y se adiciona AG a las 24 horas de fermentación. En la **Figura 14**, se observa una mayor producción de la actividad cuando el inóculo es de 1ml, luego el de 2.0 ml (**Figura 14B**) y finalmente el de 4.0 ml (**Figura 14C**). Los valores a las 120 horas de fermentación fueron: 28.3 U ml⁻¹ F, 18.6 U ml⁻¹ F, y 18 U ml⁻¹ F respectivamente. Tomando como 100% la actividad obtenida con 1.0 ml de inóculo, hay una disminución en la producción del 34% en cultivos con 2.0 ml de inóculo y del 36% con 4.0 ml. Es importante señalar, que fue similar la disminución de la producción en cultivos sin adición de AG, pues se observa que

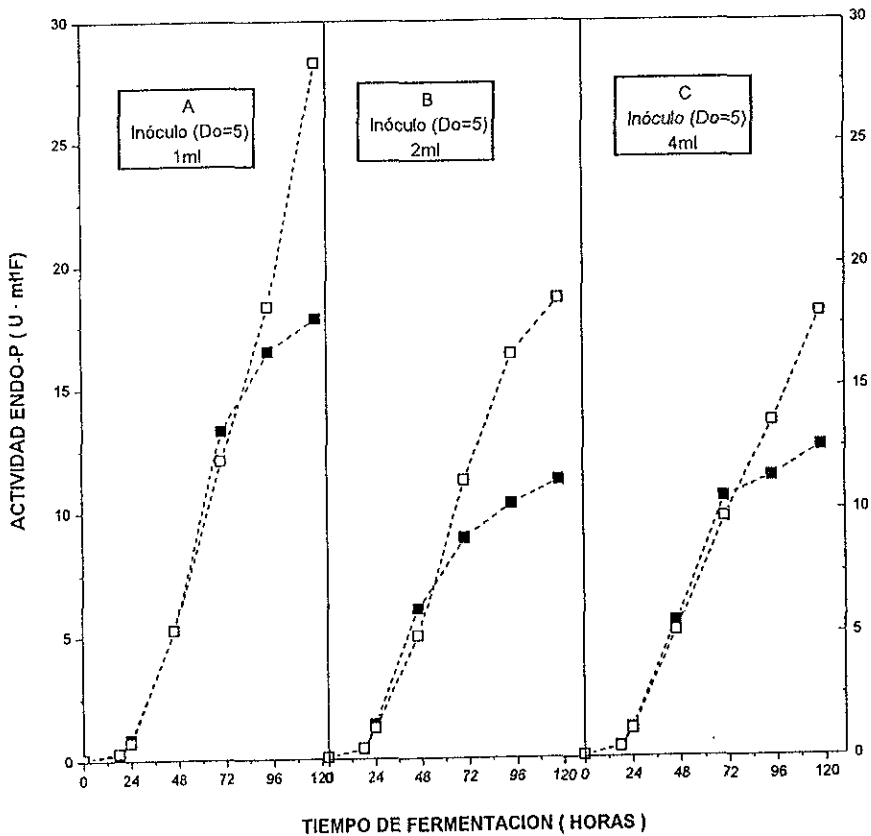


FIGURA 14 Efecto de la concentración de inóculo en la producción de la actividad endo-pectinolítica cuando se adiciona AG (1.0 mg ml^{-1}) a las 24 horas, por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 2% en las condiciones descritas en la Figura 1. Inóculo de 1.0 ml (A); de 2.0ml (B), y de 4.0ml (C) Control, sin adición de AG, (-■-), con adición de AG (-□-).

la actividad endo-P también decrece cuando se incrementa la concentración de inóculo a 2.0 ml y 4.0 ml con un decremento de la actividad del 34% con 2.0 ml y 27% con 4.0 ml, en relación a la actividad con 1.0 ml de inóculo. Sin embargo el efecto estimulador, por adición del AG, se presenta en todos los casos, es decir, existe mayor producción de la actividad en cultivos a los que se adicionó AG en relación a los que no se adicionó, de hecho el porcentaje de estimulación fue de 65%, 65% y 44%, con 1.0, 2.0 y 4.0 ml respectivamente.

Es interesante hacer notar que existe mayor producción de endo-P, cuando se inocula con 1.0 ml de la suspensión de esporas, a pesar que la proteína extracelular es mayor con los inóculos de 2.0 ml y 4.0 ml (**Figura 15**). Se esperaría que entre mayor fuera el crecimiento del hongo hubiera un incremento en la producción, pero ocurre lo contrario. Este comportamiento pudiera deberse a la concentración de grupos reductores, como puede observarse en la **Tabla 2**, a las 120 horas la cantidad de reductores es mayor con 2.0 ml de inóculo y más aún en 4.0 ml (18% y 26%). Esto podría estar relacionado con la presencia de pectinasas en las esporas, ya que se ha encontrado que en *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 se forman como parte constitutiva de ellas (Aguilar y Huitrón, 1993). Por lo tanto al aumentar la concentración de esporas en el medio, hay mayor cantidad de este tipo de enzimas que degradan la CL y a su vez producen los grupos reductores que reprimen la producción de la actividad enzimática.

Por otro lado en la **Figura 16** se compara la producción específica de la actividad endo-P a los diferentes volúmenes de inóculo y se observa que se produjo un decremento en la producción específica conforme aumenta la concentración de inóculo en cultivos con adición de AG. La producción específica a las 120 horas de fermentación fue de 45.4 U mg⁻¹ proteína. con inóculo de 1.0ml

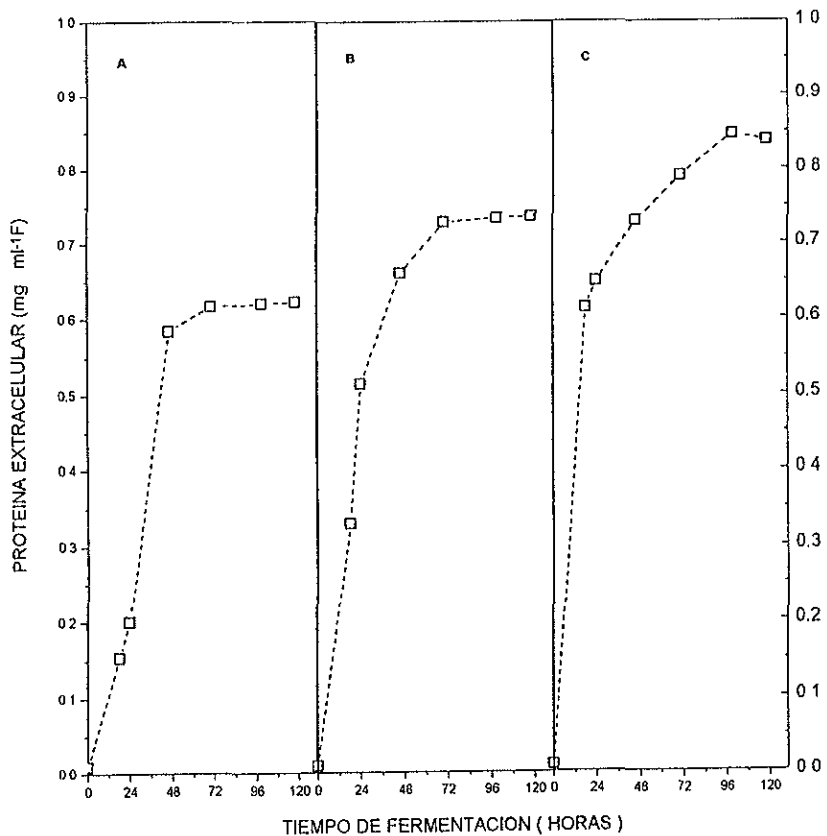


FIGURA 15. Variación de la proteína extracelular en el tiempo cuando se cultiva *Aspergillus* sp CH-Y-1043, en cáscara de limón al 2% y se adiciona AG (1.0 mg ml⁻¹) a las 24 horas. Inóculo de 1.0 ml (A), de 2.0 ml (B); y de 4.0 ml (C)

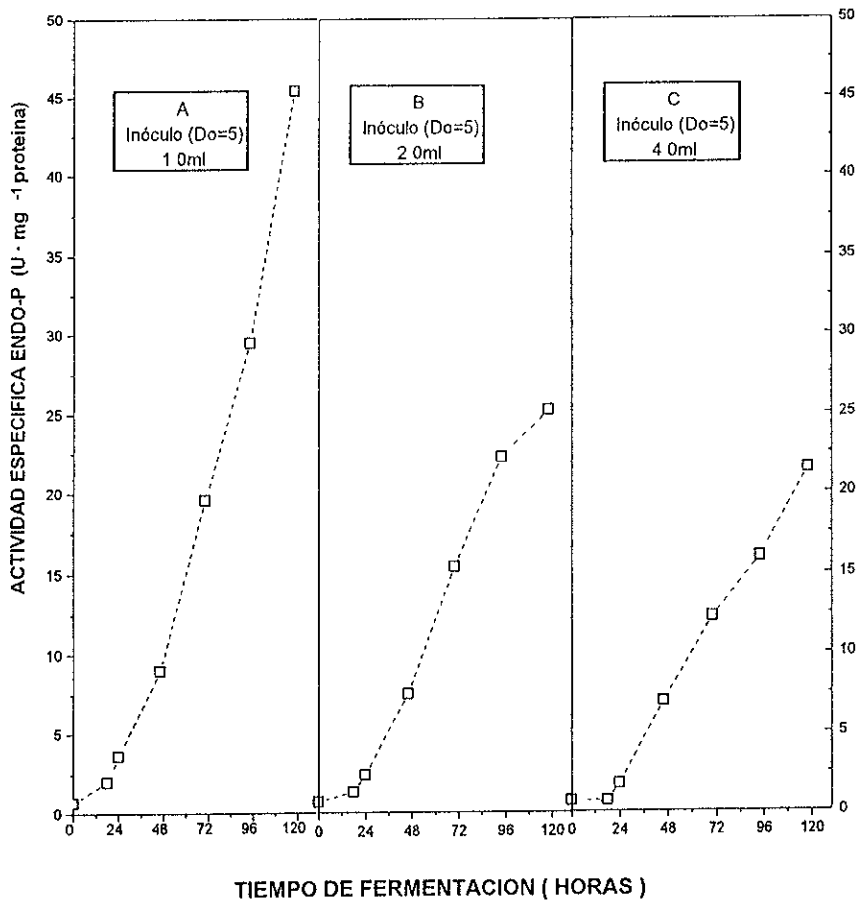


FIGURA 16. Producción específica de endo-pectinasas extracelulares, durante la fermentación, por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, cultivado en cáscara de limón al 2% con adición de AG (1.0 mg·ml⁻¹) a las 24 horas, en las condiciones descritas en la Figura 1. Inóculo de 1.0 ml (A); de 2.0 ml (B); y de 4.0 ml (C)

25.2 U mg⁻¹ proteína, con 2.0 ml; y 21.5 U mg⁻¹ proteína, con 4.0 ml, lo cual indica un decremento en la producción del 45% y 53% con 2.0 ml y 4.0 ml, respectivamente en relación a la actividad obtenida con 1.0 ml (100%). Es interesante señalar, que esta disminución se explica en parte, a que la proteína extracelular (0.84mg ml⁻¹), es mayor cuando se inoculan 4.0 ml y 2.0 ml (0.74 mg ml⁻¹) y menor cuando se inocula 1.0 ml (0.62 mg ml⁻¹) y como la actividad específica es una relación de la actividad volumétrica entre la proteína, entonces la producción específica disminuye a mayor concentración de inóculo.

En general los resultados indican que hay mayor desarrollo del microorganismo cuando se inocula mayor concentración de esporas en el medio de fermentación pero, en estas condiciones la producción de la actividad endo-P es más baja lo cual puede deberse por una parte a fenómenos de represión catabólica de estas enzimas, pues como ya se explico, las endo-P se producen constitutivamente en las esporas y al incrementar la concentración de inóculo se provoca que aumente la cantidad de reductores en el medio. Por eso, la concentración de inóculo mas adecuada para obtener mayor producción de la actividad endo-P es la que se obtiene cuando se inocula 1.0 ml de la suspensión de esporas por cada 100.0 ml del medio de fermentación, que por cierto fue la concentración utilizada en los experimentos anteriores.

TABLA 2. Concentración de grupos reductores en el medio de cultivo cuando se inoculan diferentes volúmenes de una suspensión de esporas de *Aspergillus* sp CH-043

Inóculo D.Ot=5 (ml · 100ml ⁻¹)	Concentración G.R (umol ml ⁻¹)	Concentración relativa (%)
1	1.58	100
2	1.87	118
4	1.99	126

V. CONCLUSIONES

- 1.- La producción de endo-pectinasas extracelulares por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, se estimula considerablemente cuando se cultiva en cáscara de limón como fuente de carbono y se adiciona ácido galacturónico (AG) a las 24 horas. El efecto estimuladorio es menor si la adición de AG se hace a las 0, 12, 18, ó 36 horas.
- 2.- El efecto estimuladorio en la producción de endo-pectinasas parece ser específico del AG, ya que no se presenta estimulación en la producción, cuando se adiciona glucosa en vez de AG bajo las mismas condiciones experimentales.
- 3.- La estimulación de la producción de las endo-pectinasas por adición de AG, es mayor a pH de 2.8.
- 4.- La producción de endo-pectinasas fue mayor cuando se cultivó *Aspergillus* sp CH-Y-1043 en 2% de cáscara de limón (CL), sin embargo el efecto estimuladorio fue 30% menor que cuando se utilizó CL al 1%.
- 5.- Tomando como 100%, la producción de endo-pectinasas en las condiciones iniciales: sin adición de AG y cáscara de limón al 1%, se alcanzó una producción final del 400%, cuando se adiciona AG ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se cultiva al hongo en cáscara de limón al 2%.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, G. y Huitrón, C. (1986). *Enzyme and Microbiol. Technol* 9: 541-545
2. Aguilar, G. y Huitrón, C. (1990). *Biotechnology Letters* 12 (9): 655-660.
3. Aguilar, G. y Huitrón, C (1987). *Enzyme and Microbial Technol.* 9: 690-696.
4. Aguilar, G. y Huitrón, C. (1993). *FEMS Microbiology Letters* 108 : 912-917
5. Aguilar, G., Trejo, B., Garcia, J. y Huitrón, C. (1991) *Can. J. Microbiol.* 37 . 912-917.
6. Be Miller, J.N. (1986). In: *Chemistry and function of pectins*. Fishman, M.L. and J.J. Jen (Eds.) American Chem Soc. Symposium Series, 310,2.
7. Bourgeois, S. (1971). En: *Curr. Top. Cell. Regul.* 4 : 39.
8. Carder, J.H., Hignett, R.C. y Swinburne, T.R. (1989). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 441-452.
9. Clark, J.M. y Switzer, R.L. (1977). *Protein*. En *Experimental Biochemistry*. Ed. W.A. Freeman and Coman. pp. 75-77.
10. Coughlan, M.P, y Hazlewood, G.P., (1993). *Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems*. En *Hemicellulose and Hemicellulases*. Editado por Coughlan M.P. et. al. Ed. Portland Press Ltd. pp. 53-52.
11. Deuel, H. y Stutz, E (1958) *Adv. Enzymol* 20: 341-382
12. Englesberg, E. y Wilcox., G. (1974). *Eur. J. Biochem.* 48 . 603.
13. Flores, M.E., Pérez, R., y Huitrón, C. (1996). *Letters in Applied Microbiology*, 24 : 410-416.
14. Fogarty, W.M. y Kelly, C.T (1983). En: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Fogarty, W.M. Ed.) Applied Science Pubs. London. pp. 131-182.
15. Fogarty, W.M. y Ward, O.P (1974). *Appl. Microbiol.* 27: 346
16. Holz, G. y Knox-Davies, P.S. (1986) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28: 403-410.

17. Jacob, F. y Monod, J. (1961). *J. Mol. Biol.* 3 : 318.
18. Jianping, Xu., Masahiro, Nogawa; Hirofumi, Okada; y Yasushi, Morikawa. (1998). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (8): 1555-1559.
19. Keen, N.T. y Horton, J.C. *Can J. of Microbiol.* (1966). 12: 443-453.
20. Larios, G., García, J.M. y Huitròn, C. (1989). *Biotechnology Letters* II (10) : 729-734.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
22. Luh, B.S. y Phaff, M.J. (1951). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33: 212.
23. Maldonado, M.C., Strasser, de Saad, A.M. y Callieri, D. (1989). *Curr. Microbiol.* 18:303-306.
24. Miller L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426-428.
25. Morino, Y. y Snell E. (1967). *J. Biol. Chem.* 54 : 439
26. Moses, V. y Prevost, C. (1966). *Biochem. J.* 100 :338.
27. Ortiz, G. (1991) Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
28. Pérez, R. (1996). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
29. Perley, A.F. y Page, O.T. (1971) *Can. J. Microbiology.* 117 : 415-420.
30. Perlman, R.L., Crombrughe, B. y Pastan, Y. (1968), *Science* 169 : 339.
31. Phaff, H.J. (1974). *Arch. Biochem.* 13 : 67-81.
32. Pilnik, W. (1982). *Proc. Inter. Symp. Use of enzymes in Food Technology.* Versailles, France. pp. 425.
33. Pilnik, W. y Rombouts, F.M. (1981). En *Enzymes and Processing* Birch, G., Blakebrough, N. y K.J. Parker (Eds.) Applied Science Pubs. London. 6 : 105.
34. Pilnik, W. y Voragen, A. (1993). Pectic enzymes in Fruit and vegetable juice manufacture In: *Enzymes in food processing.* Ed. by Nagodwithana G. (Ed.). Academic Press. Inc 363-399
35. Porwal, S. y B. Chakravarli. (1970). *Acta Phytopathologica.* 5 : 327.

36. Rombouts, F.M. y Pilnik, W. (1980). *Economic Microbiol.* 5 : 227-282.
37. Shinmyo, A., Davis, I.K., Nomomoto, F., Tahara, T y Enatsu, T. (1978) *Eur J. Appl. Microbiol.* 5 : 59-68.
38. Saval, S. (1985). Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
39. Solis, S. (1988). Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM
40. Taylor, M.J. y Richardson T. (1979). *Adv Appl. Microbiol.* 25 : 7-35.
41. Van Buren, J.P. (1991). Funtion of pectin in plant tissue structure and firmness. In: *The Chemistry and Technology of Pectin*. Reginal W.H. (Ed.). pp. 1-36. Academic Press.
42. Velasco, J.G. (1968). *Tecnol. Alim.* 3 : 24-33.
43. Visser, J. y Voragen, A. (1996). *Progress in Biotechnology* 14. Pectins and Pectinases, Edited by J.Visser y A. Voragen. p.p 191-205.
44. Voragen, A., y Pilnik, W., (1969). Pektin depolymerasen. *Mitt Laborat. Lebensmittel Chemie und Lebensmittel Mikobiologie Landwirtschaft. Hochschule Wageningen.*
45. Voragen, A., Pilnik, W., Thibault, J.F., Axelos, M.A. y Renard, C.P. (1995). Pectins. In *Food polysaccharides and their applications*. Ed. Stephen, A.M. pp 287-289. Marcel Dekker.
46. Whitaker, J.R. (1990). En: *Microbial enzymes and Biotechnology*. 2nd. Edition. Fogarty, W. M. y C. T. Kelly (Eds.) Academic Press. 4 : 133-176.